

SÉRIE A N° 116

N° D'ORDRE

138

THÈSES

PRÉSENTÉES

A la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Dimitrie TRIANDAFIL

Licencié es Sciences

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude des échanges entre les cellules de levure et le milieu, pendant et après la fermentation alcoolique.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 29 ¹⁹²⁴ Mars devant la Commission d'examen.

MM. J. PERRIN, *Président*.

M. GUICHARD, {
A. FERNBACH, { *Examineurs*.

PARIS

ÉDITIONS DE LA VIE UNIVERSITAIRE

13, QUAI DE CONTI

1924



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude des échanges entre les cellules de levure et le milieu, pendant et après la fermentation alcoolique.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

SÉRIE A N° 116

N° D'ORDRE

138

THÈSES

PRÉSENTÉES

A la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Dimitrie TRIANDAFIL

Licencié ès Sciences

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude des échanges entre les cellules de levure et le milieu, pendant et après la fermentation alcoolique.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 28¹⁹²⁴ Mars devant la Commission d'examen.

MM. J. PERRIN, *Président.*

M. GUICHARD, {
A. FERNBACH, { *Examineurs.*

PARIS

ÉDITIONS DE LA VIE UNIVERSITAIRE

13, QUAI DE CONTI

1924

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen MOLLIARD, *Professeur*. Physiologie végétale.

Doyen honoraire .. P. APPELL.

Professeurs honoraires ..

P. PUISEUX.

VÉLAIN.

BOUSSINESQ.

PRUVOT.

EMILE PICARD

KOENIGS

GOURSAT.

HALLER

JOANNIS

JANET

WALLERANT

ANDOYER

PAINLEVÉ

HAUG

H. LE CHATELIER

Gabriel BERTRAND

Mme P. CURIE

CAULLERY

C. CHABRIÉ

G. URBAIN

Emile BOREL

MARCHIS

Jean PERRIN

ABRAHAM

CARTAN

Cl. CUICHARD

LAPICQUE

GENTIL

VESSIOT

Professeurs

COTTON

DRACH

C. FABRY

Charles PÉREZ

LÉON BERTRAND

LESPIEAU

LEDUC

RABAUD

PORTIER

DANGEARD

MONTEL

MAURAIN

WINTREBERT

DUBOSQ

HÉROUARD

Rémy PERRIER

SAGNAC

BLAISE

PÉCHARD

AUGER

M. GUICHARD

GUILLET

JULIA

MAUGUIN

BLARINGHEM

MICHEL-LÉVY

Secrétaire

Daniel TOMBECK



A M. LE DOCTEUR ROUX,

Membre de l'Institut,

Directeur de l'Institut Pasteur.

A. M. A. FERNBACH,

Maître de conférences à la Sorbonne,

Professeur à l'Institut Pasteur.

Témoignage de reconnaissance.

A MES PARENTS,

Témoignage de profonde affection.

A MA FEMME,

à qui je dois ma connaissance du Français.

INTRODUCTION

L'étude de la fermentation alcoolique a intéressé depuis longtemps les chimistes. Dès que Pasteur a eu établi scientifiquement qu'elle est due aux cellules de levure et qu'il a mis à notre portée les méthodes techniques qui permettent de cultiver et d'étudier d'une manière approfondie la vie du ferment, une foule de recherches ont été entreprises, dans le but d'élucider le problème.

Ce qu'il faut remarquer, tout d'abord, c'est que les résultats de ces recherches ne concernent pas seulement la vie intime de ce microorganisme, mais qu'ils sont, d'une part, d'une importance capitale pour toutes les industries qui utilisent, ou qui se rattachent à l'emploi d'un microorganisme ; d'autre part, qu'ils ont permis de jeter une nouvelle lumière sur la vie, non seulement des microorganismes en général, mais sur celle des végétaux et animaux supérieurs.

Mais le terrain est loin d'être épuisé, et nous sommes convaincus que la petite cellule de levure ne nous a pas encore donné tous les enseignements qu'on peut en tirer. C'est en partant de l'étude d'organismes monocellulaires simples, à fonctions réduites et faciles à manier, qu'on peut arriver à entrevoir les principes généraux, qui font la base de l'évolution de la matière vivante.

Encouragés par ces considérations, nous avons entre-

pris le présent travail dans le laboratoire de fermentations de l'Institut Pasteur de Paris, sous la haute direction de notre maître, M. A. Fernbach. Ses conseils, prodigués en temps opportuns, nous ont permis d'obtenir les résultats que nous exposerons plus loin.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer ici notre profonde reconnaissance.

Nous tenons également à remercier M. Schoen, son collaborateur distingué, de la sollicitude qu'il n'a cessé de nous témoigner au cours de ce travail.

Contribution à l'étude des échanges entre les cellules de levure et le milieu pendant et après la fermentation alcoolique

PREMIÈRE PARTIE

Recherches sur l'assimilation et l'excrétion par la levure de l'azote ammoniacal et aminé

CHAPITRE PREMIER

Considérations générales sur la nutrition azotée de la levure. Etat de nos connaissances à ce sujet.

L'alimentation azotée de la levure constitue un problème, dont tout expérimentateur scientifique et tout praticien s'intéressant à la vie de cet organisme doit tenir compte. L'azote est un élément indispensable à la levure au même titre que le carbone. En absence d'azote, elle ne peut accomplir ni sa fonction de végétal, ni celle de ferment alcoolique. On comprend aussi le grand nombre de travaux qui ont été effectués en vue d'éclaircir la question.

En distillant en présence de potasse, le résidu soluble d'un liquide fermenté, Döbereiner trouve de l'ammonia-

que et conclut que la levure, en faisant fermenter une solution sucrée, perd son azote sous forme ammoniacale.

Cette conclusion convenait admirablement à Liebig, qui voulait à tout prix rapprocher la fermentation alcoolique du phénomène de la putréfaction, appuyé sur le fait que dans les deux cas il y a dégagement d'ammoniaque, donc décomposition de la matière vivante.

C'est dans le but de combattre cette fameuse théorie allemande que Pasteur entreprit le dosage de l'ammoniaque avant et après la fermentation, en utilisant non plus un alcali fort, qui détruit les matières albuminoïdes du milieu, mais un alcali faible, comme la magnésie (1). Il démontra ainsi que, loin de se décomposer avec dégagement d'ammoniaque, la levure en absorbe au contraire avec avidité de fortes quantités pendant la fermentation.

Ainsi, Pasteur a mis en évidence l'avidité de la levure pour l'ammoniaque. On a vu plus tard que les substances azotées auxquelles la levure peut s'attaquer sont extrêmement nombreuses et appartenant à des classes bien différentes.

Actuellement, tout le monde est d'accord pour admettre : *que la levure peut utiliser des substances azotées très simples, comme l'ammoniaque et les acides aminés, des substances plus complexes, comme les peptones et les albumoses et qu'elle absorbe ces substances d'au-*

(1) Cette méthode a d'abord été préconisée et utilisée par Boussingault, pour le dosage de l'ammoniaque en présence d'autres substances azotées.

tant plus facilement que leur constitution est plus simple. Entre toutes, c'est l'azote sous forme ammoniacale qu'elle absorbe avec plus de facilité.

Quand plusieurs matières azotées sont présentes dans le milieu, la levure fait un choix, qui dépend entre autres de la température, de la race de la levure et surtout suivant qu'il s'agit de sa fonction de ferment alcoolique ou de simple cellule végétale en voie de multiplication.

CHAPITRE II

Excrétion d'azote par la levure. Description de quelques travaux antérieurs.

La vie de tout organisme est caractérisée par un échange continu de substances, entre le milieu extérieur et l'organisme lui-même. Et si les quantités considérables de gaz carbonique et d'alcool, produites pendant la fermentation, ont permis aux premiers expérimentateurs de considérer ceux-ci comme des produits de désassimilation, provenant de matières hydrocarbonées assimilées, ce n'est qu'assez tard qu'on s'est aperçu que l'absorption de matières azotées entraîne elle aussi une désassimilation analogue. Elles ne diffèrent de la première que par sa moindre importance qualitative et quantitative.

Les premières remarques sur l'élimination de matières azotées par la levure ont été faites par Pasteur. Voici

ce que nous dit Duclaux, à ce sujet, dans son traité de Microbiologie (1) :

« M. Pasteur a le premier constaté que, lorsqu'on évapore à consistance d'extrait un liquide fermenté et qu'on débarrasse cet extrait de tous les produits connus de la fermentation qui proviennent du sucre, on obtient un résidu azoté, fourni à peu près exclusivement par la levure, se rapprochant de celui qu'on obtiendrait dans les mêmes conditions, en traitant de la levure fraîche, mais s'en éloignant d'autant plus que la fermentation a davantage épuisé la levure et que celle-ci a eu à transformer un poids de sucre plus considérable par rapport au sien. Cette sorte de résidu vital des cellules est, en outre, bien moins propre à alimenter une fermentation nouvelle, où on n'introduirait que lui comme aliment azoté, et il l'est d'autant moins qu'il provient d'une levure plus épuisée. »

Duclaux (2) s'est aperçu que, dans un liquide sucré en fermentation, le poids de levure récolté au moment de la fermentation tumultueuse est supérieur à celui récolté après la fin de la fermentation. On a remarqué également qu'en ensemençant un liquide sucré avec une dose massive de levure, on arrive à recueillir après la

(1) E. DUCLAUX. Traité de microbiologie. Paris 1900. Tome III.

(2) E. DUCLAUX. Sur l'absorption d'ammoniaque et production d'acides gras volatils pendant la fermentation alcoolique. *Annales de l'Ecole Normale Supérieure*. I. II 1868.

fermentation un poids de levure inférieur au poids initial introduit.

J. Laborde (1), en faisant des expériences comparatives à 25° et à 36°, en vue d'étudier l'assimilation azotée à diverses températures, arrive à la conclusion que la levure excrète des quantités notables de composés azotés, notamment des formes azotées complexes, et que cette excrétion est favorisée par une température élevée. Dans ses expériences sur le moût de raisin, l'auteur arrive à démontrer qu'à 25° la levure préfère l'azote ammoniacal à l'azote complexe, tandis qu'à 36° la levure semble marquer une préférence accentuée pour les substances azotées complexes. De là résulterait une plus forte excrétion de matières azotées complexes à 36° qu'à 25°. Si l'on admet que le phénomène d'autolyse, dont les vieilles cellules de levure sont le siège, prend une part importante dans cette excrétion d'azote, on comprend facilement aussi pourquoi l'auteur remarque une excrétion plus considérable à 36° qu'à 25°.

Des travaux également intéressants à ce sujet ont été publiés par Delbrück (2). L'auteur attribue au phénomène d'autodigestion la totalité de l'azote excrété. L'excrétion peut avoir lieu en même temps que l'assimilation, celle-ci prédominant au début de la fermentation, tandis que l'excrétion se fait sentir à la fin.

(1) J. LABORDE. Contribution à l'étude de l'azote contenu dans le vin. *Annales de l'Institut Pasteur*, T. XII, p. 517. 1898. — *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, T. I, p. 388 et 412. 1898.

(2) DELBRÜCK. *Zeitschrift für Spiritusindustrie* 1878-1881.

Hayduck (1) confirme ces résultats, en mentionnant que la quantité d'azote que la levure cède au liquide augmente avec la richesse de celui-ci en azote, avec la durée de la fermentation et avec la température.

Des renseignements encore plus intéressants nous ont été fournis dernièrement par L.-H. Lampitt (2). La partie finale de son travail est consacrée entièrement au problème de l'excrétion d'azote par la levure.

L'auteur fait remarquer tout d'abord que le terme « excrétion » n'est pas juste pour désigner le phénomène, et qu'on ne l'emploie couramment qu'à défaut d'un autre ; en effet, une bonne partie des corps azotés « excrétés » peuvent être réassimilés par la levure et lui permettre ainsi de faire fermenter une nouvelle quantité de sucre.

Les conclusions de l'auteur, intéressant directement notre travail, sont les suivantes :

1° L'excrétion d'azote par la levure constitue un phénomène vital et n'est pas due à la zymase, car la levure tuée et active ne cède que très peu d'azote au liquide qu'elle a fait fermenter ;

2° La quantité d'azote excrétée augmente avec l'activité fermentative, mais les deux phénomènes ne sont

(1) HAYDUCK. Sur le rôle de la matière azotée dans la vie de la levure. *Wochenschrift für Brauerei*, 1905. — *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, 1906, p. 111-128.

(2) L. H. LAMPITT. Le métabolisme de l'azote chez le « *saccharomyces cerevisiae* ». *Biochemical Journal*, vol. 13, p. 459, 1919. — *Annales de la Brasserie et de la Distillerie* 1920, p. 132, 145, 163.

pas étroitement liés, car l'excrétion peut se poursuivre même après la disparition complète du sucre dans le milieu ;

3° Les quantités croissantes de sucre augmentent la quantité d'azote excrétée, surtout pour des proportions de sucre variant de 1 à 5 0/0 ;

4° Les phénomènes d'assimilation et d'excrétion d'azote peuvent avoir lieu concurremment ;

5° L'azote ne semble pas être excrété sous forme d'acides aminés et est précipité par l'acide phosphotungstique dans la proportion de 35 0/0 environ ;

6° La quantité d'azote excrété augmente avec le nombre des cellulesensemencées ;

7° Elle a deux origines. Elle peut provenir soit d'une excrétion normale se rattachant à la vie intime de la cellule, soit d'une autodigestion des vieilles cellulesensemencées.

De tous les travaux publiés concernant le problème qui nous occupe, c'est celui-ci qui nous a paru le plus intéressant. En effet, pour établir le rôle des matières azotées dans la vie de la levure, l'auteur ne s'est pas contenté de doser celles-ci avant et après la fermentation, mais il a fait des analyses à tous les stades de l'expérience.

Nous devons enfin mentionner encore deux travaux, antérieurs à celui de Lampitt, qui, bien que n'ayant pas comme objet principal d'étude, l'excrétion d'azote par la levure, renferment néanmoins des renseignements qui intéressent directement notre question.

Le premier a été publié par Pringsheim (1) en 1907. Entre autres, l'auteur affirme que la levure n'excrète jamais d'ammoniaque. Nous aurons à revenir sur ce point et il constituera l'objet principal de notre travail.

Presque à la même époque, Ehrlich (2), à la suite de son importante étude sur l'assimilation des acides aminés par la levure et la formation de l'huile de fusel, affirme que la matière protéique des cellules de levure ne joue qu'un rôle effacé dans la formation de l'huile de fusel (ce qui veut dire que la levure ne cède pas au liquide des acides aminés) et que ce phénomène ne peut avoir lieu au dépens de cette substance que si la levure se trouve en milieu exempt d'aliments azotés et placée à haute température. L'auteur mentionne, en outre, que dans la désamination des acides aminés par la levure, on ne trouve, à aucun moment de l'expérience, de l'ammoniaque dans le milieu, celle-ci étant absorbée par la levure, au fur et à mesure de sa formation, pour la synthèse de la matière protoplasmique.

Quant au sujet de la nature des substances azotées

(1) PRINGSHEIM. Sur l'alimentation azotée de la levure. *Biochemische Zeitschrift*, T. 3, 121-286, 1907.

PRINGSHEIM. Influence de la constitution chimique de l'aliment azoté sur le pouvoir ferment de la levure. *Ber. der deutsch. chem. Gesellschaft*, T. 39, p. 4048. — *Ann. de la Brass. et de la Dist.* 1907, p. 107 et 231.

(2) EHRLICH. Sur les conditions de la formation de l'huile de fusel ; ses relations avec la synthèse des albuminoïdes chez la levure. *Ber. der Deutsch. chem. Gesellschaft*, T. 40, p. 1027 (1907).

excrétées par la levure, nous trouvons également quelques renseignements dans un travail de Wahl et Nilson (1).

En faisant des expériences comparatives dans l'eau pure et dans une solution de saccharose à 10 o/o, les auteurs trouvent qu'en présence de sucre, c'est-à-dire quand il y a fermentation, la matière azotée que la levure déverse dans le liquide, est plus abondante que celle qu'elle déverse dans l'eau pure. Alors que la matière azotée perdue par la levure au cours de la fermentation se trouve riche en peptones, celle qu'elle excrète dans l'eau pure renferme une forte proportion d'amides et très peu de peptones.

CHAPITRE III

Recherches sur l'excrétion d'azote par la levure.

Description de la technique employée. Le vin eucré comme milieu de fermentation. Conclusions.

L'irrégularité fréquente de la fermentation en bouteille des vins de Champagne ayant attiré notre attention, nous nous sommes proposé d'étudier quels sont les besoins en azote de la levure pendant cette fermentation, et surtout de quelle manière elle se comporte vis-à-vis des matières azotées du vin.

(1) WAHL ET NILSON. Transformation des matières albuminoïdes de la levure, au repos et pendant la fermentation. *Amer. Brewer Review*, 1902, p. 37. *An. de la Brass.* et de la Dist. T. 5, 1902, p. 489.

Les conditions physiques et chimiques d'une fermentation en bouteille de vins mousseux, étant tout à fait autres que celles d'une fermentation ordinaire de moût de raisin, les besoins en azote de la levure pourraient s'en trouver aussi notablement modifiés.

Nous avons surtout porté notre attention sur les faibles quantités d'ammoniaque et d'acides aminés, qui se trouvent dans un vin normalement constitué, et qui sont les formes d'azote les plus recherchées par la levure.

Après avoir donné quelques indications sur les méthodes analytiques ainsi que sur la technique bactériologique employées, nous exposerons par des chiffres le résultat de plusieurs expériences, qui nous ont paru intéressantes.

**Méthode employée pour le dosage dans le vin,
de l'ammoniaque et des acides aminés.**

La question du dosage de l'ammoniaque dans des liquides renfermant d'autres composés azotés organiques, a été longuement étudiée et plusieurs méthodes ont déjà été préconisées. Leur nombre relativement grand, est loin de constituer une garantie de leur rigoureuse exactitude.

Toutes ces méthodes reposent généralement, soit sur le déplacement de l'ammoniaque par les carbonates alcalins et distillation ultérieure sous faible pression à 35° à 40° (méthode de Muntz, méthode de Folin) (1),

(1) O. FOLIN. Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harne und anderen thierischen Flüssigkeiten. *Zeitschr. f. physiol. chem.* t. XXXVII, p. 161, 1902-1903.

soit sur le déplacement de l'ammoniaque au moyen de magnésie, suivi de distillation sous pression réduite (méthode de Nencki et Zaleschi) (1) soit enfin sur l'absorption de l'ammoniaque sous une cloche, au moyen de l'acide sulfurique (méthode de Schlöesing) (2).

Toutes ces méthodes (3), déjà loin d'être rigoureuses, nous ont paru trop longues et nécessitant souvent un appareillage assez compliqué.

Etant donné le grand nombre d'expériences que nous avons eues à faire, nous avons adopté une méthode assez rapide et en même temps suffisamment rigoureuse, pour nous permettre de doser avec exactitude les faibles quantités d'ammoniaque et d'acides aminés qu'on trouve généralement dans les vins normaux.

Cette méthode a été préconisée par Ronchèse (4) et

(1) NENCKI ET ZALESCHI. Sur le dosage de l'ammoniaque dans les liquides et les organes animaux. *Zeitschr f. physiol. chem.* t. XXXIII, p. 193, 1901.

(2) SCHLOESING. Mémoire sur le dosage de l'ammoniaque. *Ann. de Chimie et de Physique*, série 3, T. XXXI, p. 153, 1851. Cette méthode, vulgarisée en Allemagne par Neubauer, est injustement nommée dans ce pays : méthode de Neubauer et Schloesing.

(3) ...Une revue critique de toutes ces méthodes a été faite par le docteur Armand Lanzenberg, dans une thèse de doctorat en médecine. L'ammoniaque et l'urée. Origines. Méthodes de dosage, Paris, 1912.

Dans la revue *Chimie et Industrie*, octobre 1922, M. J. Froideveau présente également un aperçu très intéressant de toutes les difficultés que présente le dosage de l'ammoniaque, en indiquant les méthodes qui peuvent être utilisées avec succès.

(4) RONCHÈSE. Nouveau procédé de dosage de l'ammoniaque. *Bul. soc. chim.*, T. I, p. 900, série 4.

repose sur la combinaison du formol avec l'ammoniaque et les acides aminés. Cette réaction a été étudiée et mise au point par Sørensen (1).

La méthode est rapide, ne demande aucun appareillage spécial et nous permet ainsi d'éviter les distillations trop longues, sous pression réduite, qui demandent à être surveillées avec attention.

Le mode opératoire est le suivant :

Sur une portion du liquide à analyser, on effectue tout d'abord un dosage au formol, d'après les indications données par Sørensen. Dans ce but, on neutralise le liquide avec de la soude diluée, en présence de phénolphtaléine (2) ; on ajoute un excès de formol (10 cc de formol commercial pour 0.014 gr. d'azote titrable) préalablement neutralisé. Il y a formation d'hexaméthylène tétramine, et le liquide devient nettement acide. Par titration de l'acidité formée, on déduit la quantité globale d'ammoniaque et d'acides aminés présente dans le liquide. Une autre portion du liquide à analyser est additionnée de 0 gr. 5 de magnésie et évaporée sur bain-marie pendant au moins trois heures. L'ammoniaque se volatilise et les acides aminés restant seuls sont titrés de la manière déjà indiquée.

Comme nous avons utilisé toujours pour nos expé-

(1) S.P.L. SØRENSEN. Sur la mesure quantitative des scissions protéolytiques. Titration au formol. *Comptes Rendus du laboratoire de Carlsberg*, vol. 7, 1907.

(2) Il ne faut pas perdre de vue que la phénolphtaléine est le seul indicateur coloré qui puisse être employé dans cette titration, l'hexaméthylène tétramine formée, ayant des propriétés basiques vis-à-vis des autres indicateurs.

riences des liquides colorés (vin, eau de touraillons) pour rendre le virage de la phénolphtaléine suffisamment net, nous avons décoloré ces liquides avant chaque analyse, au moyen de noir animal en poudre, lavé à l'acide chlorhydrique.

Nous nous sommes assurés préalablement que ce produit n'enlève et n'abandonne au liquide aucune trace d'azote titrable au formol.

Pour plus de sûreté, nous avons utilisé dans toutes nos expériences comparatives le même noir animal et en même proportion, pour éviter ainsi toute erreur que ce produit pourrait occasionner.

En ce qui concerne l'évaporation de l'ammoniaque sur le bain-marie, il nous a fallu tenir compte du fait, que la durée de l'évaporation doit être d'autant plus prolongée, que le liquide est plus riche en ammoniaque. Ainsi, par exemple, pour un échantillon de 50 cc renfermant 0 gr. 020 d'ammoniaque par litre, une évaporation de trois heures est suffisante. Elle doit être de six à sept heures pour un liquide renfermant 0 gr. 050 d'ammoniaque par litre et de dix heures pour une proportion dépassant 0 gr. 100 0/00.

Une objection pourrait être faite à la méthode de dosage utilisée par nous. En effet, le traitement à chaud, par la magnésie, d'un liquide renfermant de l'azote organique sous diverses formes, comme c'est le cas dans nos expériences, doit être effectué avec précaution. La magnésie est susceptible de dégrader, avec mise en liberté d'ammoniaque, certaines substances protéiques et des acides aminés (cystine et arginine).

Mais il résulte, des essais de plusieurs auteurs (1), qu'en ne dépassant pas la température de 40°-45°, on ne risque pas de mettre en liberté de l'ammoniaque appartenant à des amines, amides et autres matières azotées plus complexes. Aussi, pour éviter cette erreur, nous avons toujours réglé notre bain-marie à une température d'environ 40°-45°, ce qui explique aussi la longue durée d'évaporation à laquelle nous avons été obligés de soumettre nos échantillons.

Pour pouvoir utiliser le mode opératoire déjà indiqué, il nous a fallu tenir compte encore du fait suivant :

Pour établir son procédé de dosage de l'azote au formol, Sørensen a utilisé des solutions relativement riches en acides aminés et en ammoniaque, lui permettant d'employer des solutions alcalines titrées, concentrées, ce qui rendait le virage de la phénolphthaléine suffisamment net. Ce n'était pas du tout notre cas, car nous avons eu affaire à des vins qui ne renfermaient que 20-25 milligrammes d'ammoniaque par litre, ce qui nous a obligés à enregistrer des variations de concentration en ammoniaque ne dépassant pas quelques milligrammes par litre.

Nous avons fait une série de dosages sur des solutions d'oxalate d'ammoniaque, d'asparagine et de glyco-colle purs, ne renfermant que quelques milligrammes d'azote par litre.

En utilisant une solution de soude N/20, nous som-

(1) DUCLAUX, MUNTZ, LABORDE, DONALD D VAN SLIKE.

mes arrivés à des résultats tout à fait satisfaisants qui se trouvent réunis dans le tableau suivant :

N° 1

	Quantité de substance dissoute	Azote corres- pondant	Nombre de cc NaOH/20 calculé pour 20 cc de la solution	Nombre de cc NaOH/20 trouvé
	gr.			
Oxalate d'ammoniaque	0.0487	0.0095	0.90	0.90
	dans 300			0.85
	0.0424	0.0083	0.80	0.75
	dans 300			0.75
Asparagine	0.1145	0.0213	1.00	1.05
	dans 300			1.00
	0.1032	0.0203	1.10	1.05
	dans 250			1.05
Glycocolle	0.0264	0.0049	1.40	1.45
	dans 100			1.45
	0.0204	0.0037	1.10	1.15
	dans 100			1.10

En ce qui concerne l'asparagine, nous avons tenu compte, dans le calcul ci-dessus, du fait que la moitié seulement de l'azote de cette substance est titrable au formol, l'autre moitié se trouvant sous forme d'amide. Afin d'augmenter le nombre de centimètres cubes de NaOH N/20 nécessaire pour neutraliser le liquide après addition de formol, nous avons opéré dans nos expériences, non plus sur 20 de ce liquide, comme précédemment, mais sur 50 cc. A la suite de ces essais préliminaires, nous avons jugé que le mode opératoire déjà indiqué pour le dosage de l'ammoniaque et des acides

aminés, pouvait être employé avec succès dans nos expériences ultérieures.

En ce qui concerne le dosage de l'alcool, il a toujours été effectué suivant la méthode Martin (1), qui consiste à recueillir l'alcool dans un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique. L'alcool est oxydé quantitativement en acide acétique, avec transformation d'une quantité correspondante de bichromate de potassium en sulfate chromique. Le bichromate étant titré et employé en quantité connue, il suffit de doser au moyen d'une solution de sulfate de fer ammoniacal la quantité non utilisée pour l'oxydation, pour déduire par un calcul très simple la quantité d'alcool de l'échantillon. Cette méthode présente l'avantage énorme de n'exiger qu'une quantité infime de liquide à analyser.

TECHNIQUE BACTERIOLOGIQUE

Ayant pris pour nos premières expériences le vin comme milieu de culture, il nous a fallu utiliser une levure énergique accoutumée à ce milieu, et pouvant faire fermenter le sucre dans un liquide renfermant déjà 8°-10° d'alcool. La levure de Champagne « Cramant » nous a semblé en état de remplir cette condition.

Comme dans une série d'expériences comparatives, il est absolument indispensable d'utiliser une même levure, se trouvant, autant que possible, dans les mêmes conditions physiologiques, nous avons conservé pour toutes nos expériences, un échantillon de levure « Cra-

(1) E. MARTIN. Détermination chimique du degré alcoolique du vin. *Moniteur Scientifique*, T. 59, 1909, p. 570.

mant » dans du vin blanc additionné de sucre, qu'elle avait fait fermenter. Toutes les fois que nous avons eu besoin de semence, nous avons rajeuni dans du vin blanc stérilisé et sucré, une faible portion de cet échantillon primitif. Une fois la levure rajeunie, elle a été étalée dans des boîtes de Roux, couvertes d'une couche d'eau de touraillons, gelosée, additionnée de sels nutritifs et de 5 o/o de sucre. Après quarante-huit heures de séjour à 25°, la semence développée a été mise en suspension dans du vin stérilisé et introduite dans les ballons d'expérience en quantité convenable. Si la levure devait servir à ensemençer de l'eau de touraillons, elle était également mise en suspension au moyen d'une faible portion de ce liquide. Avant chaque ensemençement, la pureté de la levure a été vérifiée au microscope. La même opération a été effectuée sur le dépôt des ballons devant servir à l'analyse. En procédant ainsi, on peut, sans crainte, attribuer à la levure la totalité des résultats acquis. Pour éviter l'erreur que la faible quantité de semence introduite dans chaque ballon pourrait produire, la première analyse devant établir la composition initiale du liquide, a toujours été effectuée après stérilisation et après ensemençement. On évite également ainsi l'erreur produite par l'évaporation du liquide pendant la stérilisation des ballons.

Assimilation par la levure, des faibles quantités d'acides aminés et d'ammoniaque contenues dans le vin.

Le vin ne renferme naturellement pas les mêmes composés azotés que le moût de raisin dont il provient.

Celui-ci pouvait primitivement renfermer beaucoup d'ammoniaque, alors que le vin n'en contient plus que quelques dizaines de milligrammes. Quant aux acides aminés, on n'en trouve que très peu dans le vin, et ceux-ci proviennent soit d'une autolyse de la levure qui a fait fermenter le moût primitif, soit de la quantité d'acides aminés que le moût renfermait et que la levure n'a pas pu assimiler.

Les conditions d'une fermentation en bouteille d'un vin mousseux étant donc différentes de celles d'une fermentation ordinaire de moût de raisin, les propriétés de la levure pourraient se trouver également modifiées.

Mode opératoire.

Nous avons utilisé pour nos expériences du vin blanc de Bordeaux, de constitution normale et renfermant très peu de gaz sulfureux.

Plusieurs ballons de 500 cc préalablement flambés, ont reçu chacun 300 cc de vin additionné de 3 o/o de sucre. Les ballons ont été stérilisés ensuite, par pasteurisation à 65°. On a évité la stérilisation à l'autoclave, d'ailleurs inutile, pour ne pas abaisser le titre alcoolique du vin. Après refroidissement, chaque ballon a reçu 2 cc d'émulsion de levure « Cramant » cultivée quarante-huit heures sur gélose. Nous nous sommes arrangés de façon à introduire autant de levure qu'il en est introduit ordinairement dans la fermentation des vins mousseux.

Immédiatement après ensemencement, on a procédé à l'analyse du vin sur un des ballons, les autres étant placés à l'étuve à 25°.

La fermentation commence généralement après 48-60 heures. Pour des vins riches en acide sulfureux, elle commence un peu plus tard, mais se poursuit ensuite d'une façon normale. De temps en temps, un ballon était sacrifié pour l'analyse du liquide en fermentation. Le tableau n° 2 indique le résultat de l'une de ces expériences.

N° 2

	Acidité totale en SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool volume o/o	Azote aminé o/oo	Azote ammoniacal o/oo
3 mai 1922.....	4.53	10.08	0.019	0.016
8 —	4.43	10.20	0.011	0.010
11 —	4.34	10.78	0.005	0.016
15 —	4.31	11.23	0.004	0.022
18 —	4.36	11.32	0.005	0.022
21 —	4.34	11.44	0.004	0.023

Ayant utilisé pour nos expériences plusieurs échantillons de vin blanc, nous en avons rencontré un seul qui, exceptionnellement, ne renfermait pas d'acides aminés.

Les résultats de l'expérience faite avec ce vin nous semblent intéressants et nous les avons résumés dans le tableau n° 3.

N° 3

	Acidité totale en SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Azote aminé o/oo	Azote ammoniacal o/oo
26 avril 1922.....	4.48	9.45		0.036
1 ^{er} mai 1922.....	4.50	10.02		0.028
4 —	4.50	10.39		0.025
6 —	4.60	10.64		0.020
9 —	4.43	10.78		0.016
12 —	4.41			0.029
16 —	4.43	11.02		0.028

Les résultats de cette expérience seront interprétés plus tard. Toutefois, il faut remarquer, dès à présent, que dans les conditions où nous avons travaillé, la levure n'excrète pas d'azote sous forme d'acides aminés.

Il résulte de ces expériences que, bien que le vin ne renferme que de faibles quantités d'azote ammoniacal, ce dernier n'est pas complètement absorbé par la levure et on trouve de l'ammoniaque dans le milieu à tous les stades de la fermentation. Afin de rendre la levure plus active, tant au point de vue de la multiplication qu'à celui de la fermentation, nous avons fait une autre expérience dans laquelle le vin a été additionné de 1 gr. o/oo de phosphate monopotassique. Pour éviter le grand nombre d'analyses, nous en avons fait une, après ensemencement, une seconde au moment où l'assimilation de l'ammoniaque paraît être maxima et une dernière après la fin de la fermentation. On voit que les chiffres exposés dans le tableau n° 4 ne changent pas d'allure.

N° 4

	Acidité totale en SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Azote aminé o/oo	Azote ammoniacal o/oo	
2-6-1922 ...	3.9	9.87	0.022	0.013	} Sans addition de phosphate
16-6- "	3.9	11.70	0.015	0.008	
22-6- "	3.9	11.80	0.015	0.011	
2-6-1922 ...	4.2	9.87	0.022	0.013	} Addition de phosphate
19-6- "	4.1	11.66	0.018	0.008	
22-6- " ...	4.2	11.81	0.016	0.011	

L'addition de phosphate de potassium n'a fait qu'augmenter la vitesse de la fermentation, ce qui est tout à fait naturel.

Les dosages d'alcool et d'acidité ont été faits afin de nous rendre compte le mieux possible de la marche de la fermentation.

Conclusions des expériences mentionnées

Etant donné les conditions spéciales de notre travail, nous sommes en droit de faire les remarques suivantes :

1° Malgré les faibles quantités présentes, les acides aminés ne sont pas complètement absorbés par la levure. Ce fait ne doit pas nous surprendre, le liquide renfermant, en dehors des acides aminés, d'autres substances azotées, notamment des sels ammoniacaux.

On pourrait admettre également que les acides présents dans le liquide après la fermentation ne sont pas assimilables par la levure. Cela pourrait être vérifié, en

réensemencant le liquide fermenté, préalablement débarrassé de levure et privé de sels ammoniacaux ;

2° Comme le tableau n° 3 l'indique, la levure n'excrète pas d'acides aminés.

Lampitt, dans un travail que nous avons déjà mentionné, affirme aussi que l'azote excrété par la levure ne semble pas se trouver sous forme d'acides aminés. Nous nous trouvons également en concordance avec le travail d'Erlich sur la formation de l'huile de fusel. L'auteur affirme que la matière protéique de la levure ne joue qu'un rôle effacé dans la formation de l'huile de fusel, ce qui signifie que la levure n'excrète pas d'acides aminés ;

3° Malgré la faible quantité d'ammoniaque présente, celle-ci n'est jamais absente dans le liquide ;

4° La quantité d'ammoniaque dans le liquide, augmente vers la fin de la fermentation ; il y a donc excrétion d'ammoniaque par la levure. Le résultat est inattendu et nous nous trouvons en complet désaccord avec le travail de Pringsheim (1), où il est indiqué que la levure n'excrète jamais de l'ammoniaque. Ce fait explique aussi pourquoi on trouve de l'ammoniaque dans le liquide à tout moment de la fermentation.

(1) H. PRINGSHEIM. Sur l'alimentation azotée de la levure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, T. 39, p. 4048.

CHAPITRE IV

Utilisation de l'eau de touraillons comme milieu de fermentation. — Vérification des résultats exposés au chapitre III.

Les propriétés des microorganismes varient suivant les conditions physiques de leur vie, et suivant la nature et la quantité des aliments qui se trouvent à leur disposition. Étant données les conditions spéciales de nos expériences, on n'est pas encore en droit d'affirmer, à la suite des résultats acquis jusqu'ici, que d'une manière générale la levure excrète de l'ammoniaque, dans une solution sucrée qu'elle fait fermenter.

L'acidité et la force alcoolique du vin ne sont pas de nature à rendre ce milieu favorable à la vie de la levure. En modifiant convenablement la constitution du milieu, on est arrivé à changer les propriétés physiologiques de la levure jusqu'au point de faire varier les produits de la fermentation et de détourner même la fonction principale de la cellule de levure, la fonction zymasique.

Il était donc naturel de se demander si la même levure, placée dans un milieu plus favorable que le vin sucré, à son développement, nous permettrait de faire les mêmes remarques au sujet de l'excrétion des matières azotées.

*L'utilisation de l'eau de touraillons comme milieu
de fermentation*

L'eau de touraillons sucrée et additionnée de sels nutritifs nous a paru comme étant le milieu le plus indiqué pour nos expériences. Elle a été préparée en faisant bouillir 25 grammes de touraillons avec un litre d'eau distillée. La qualité et la quantité des sels nutritifs additionnés seront indiquées pour chaque expérience.

Afin de rendre le milieu faiblement acide, on a ajouté de l'acide tartrique en proportion de 0 gr. 5 par litre. Avant l'addition de ces substances, l'eau de touraillons a toujours été collée au moyen d'un blanc d'œuf; ce qui rendait la décoloration par le noir animal beaucoup plus facile.

Première expérience. — Substances nutritives ajoutées à l'eau de touraillons : sucre 5 0/0, acide tartrique 0.5 0/00, phosphate de potassium monobasique 0.5 0/00 et traces de sulfate de magnésie. Chaque ballon recevait 300 cc de ce milieu et, après stérilisation à l'autoclave, on ensemait chaque ballon avec quelques gouttes d'une émulsion de levure « Cramant », cultivée quarante-huit heures sur eau de touraillons gélifiée.

Les résultats des différentes analyses faites au cours de la fermentation sont exposés dans le tableau n° 5.

N° 5

	Acidité totale SO ₄ H ₂ O/00	Alcool en volume O/0	Ammoniaque O/00
6-10-1922	0.56		0.023
11 " "	1.17	1.29	0.009
13 " "	1.61	2.20	0.013
16 " "	1.96	2.39	0.015

La première analyse a été faite tout de suite après l'introduction de la semence. La fermentation partait après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve à 25°.

Il résulte de nos analyses que l'eau de touraillons, telle qu'elle a été préparée par nous, ne contient pas d'acides aminés. Cela paraît surprenant, si on pense que les radicules du malt prennent naissance à un moment où la matière protéique de la graine se trouve en plein processus de dégradation.

En ce qui concerne l'assimilation de l'ammoniaque, les résultats des tableaux 3 et 4, obtenus en faisant fermenter le vin, se trouvent entièrement confirmés.

La quantité d'ammoniaque augmente vers la fin de la fermentation, sans qu'elle ait jamais été nulle.

Pour mieux mettre en évidence cette augmentation, dans le tableau 5 et les suivants, nous l'avons exprimée, non pas en azote ammoniacal, mais en ammoniaque.

Nous faisons remarquer également que notre observation, faite à l'occasion de l'interprétation du tableau 2, se trouve confirmée, c'est-à-dire que, dans les conditions de nos expériences, la levure n'excrète pas des acides aminés.

Du moment que l'excrétion d'ammoniaque se passe vers la fin de la fermentation, nous avons pensé que, peut-être, elle continue aussi après la disparition complète du sucre. Dans ce but, nous avons fait une autre expérience, pour laquelle nous avons ensemencé un plus grand nombre de ballons, afin de pouvoir faire quelques analyses, même après la disparition complète du sucre.

Seconde expérience. — Toutes les conditions du travail ont été identiques à celles de l'expérience précédente. Ses résultats se trouvent exposés dans le tableau n° 6.

N° 6	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/oo
21-10-1922	0.73		0.025
23 » »	1.61	1.76	0.008
26 » »	1.71	2.89	0.011
30 » »	1.86	2.98	0.012
3 » »	1.47	3.03	0.011
7 » »	1.44	2.98	0.011

Les chiffres ne changent pas d'allure ; ils sont identiques à ceux des expériences précédentes.

En regardant la colonne qui indique l'acidité totale aux différents stades de la fermentation, nous remarquons le fait suivant : l'acidité totale augmente au cours de la fermentation, passe par un maximum vers la fin de celle-ci, pour décroître ensuite après la disparition du sucre. Nous allons revenir en détail sur ce fait dans la seconde partie de notre travail.

Étant donné la faible quantité d'ammoniaque excrétée, ainsi que l'importance du résultat, nous avons jugé nécessaire de faire une troisième expérience, sans changer en rien les conditions du travail.

N° 7	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/oo
22-11-1922	0.71		0.034
24 » »	2.08	1.78	0.008
27 » »	1.96	2.93	0.007
29 » »	1.96	3.04	0.011
1-12-1922	1.88		0.014
4 » »	1.86	2.96	0.014
6 » »	1.47	3.02	0.016

L'excrétion d'ammoniaque a toujours lieu et le chiffre qui l'indique est du même ordre de grandeur que celui des expériences précédentes.

CHAPITRE V

Influence, sur l'excrétion d'ammoniaque, de la dose d'ammoniaque présente dans le milieu, de la proportion de sucre, et de la quantité de semence introduite.

Influence de la dose d'ammoniaque présente dans le milieu.

Grâce aux travaux de A. Stern (1) sur la nutrition de la levure, nous savons que la quantité d'azote assimilée par la levure augmente jusqu'à une certaine limite pour des quantités croissantes d'azote assimilable ajoutées au milieu de fermentation.

Hayduck (2) a démontré également que la quantité d'azote que la levure dépose dans le liquide, augmente avec la richesse du liquide en azote assimilable.

Bien que, exception faite pour l'ammoniaque que nous y introduisons, l'eau de touraillons soit loin d'être pauvre en substances azotées, nous avons pensé qu'en ajoutant au milieu des quantités croissantes d'ammoniaque,

(1) A. STERN. *La nutrition de la levure. Proc. of the chem. Society*, 9 novembre 1898. *Journal of the chem. Society*, T. 75, 201 et T. 79, 943. *Journal of the fed. of Brewing*, T. 8-690.

(2) F. HAYDUCK. Sur le rôle de la matière azotée dans la vie de la levure. *Wochenschrift für Brauerei* N° 40, 1905.

on pourrait arriver peut-être à obtenir une excrétion plus abondante.

Une levure vivant dans un milieu riche en azote assimilable contient, à la fin de la fermentation, plus de substances azotées qu'une autre, qui a été obligée de vivre dans un milieu pauvre en azote. Il est tout naturel aussi que la première soit capable de céder au liquide plus de substances azotées que la dernière.

Ces considérations nous ont amenés à entreprendre une autre série d'expériences, dans lesquelles le phosphate de potassium a été remplacé par des doses croissantes de phosphate d'ammoniaque monobasique, toutes les autres conditions restant les mêmes que dans les expériences précédentes.

Dans les deux premières expériences, l'eau de touraillons a été additionnée de 0.5 o/oo de phosphate d'ammoniaque monobasique.

Le résultat est exposé dans les tableaux n° 8 et 9.

N° 8

	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/oo
11-11-1922	0.66		0.078
13 » »	1.83	2.34	0.013
15 » »	2.08	2.82	0.010
18 » »	1.56	2.92	0.013
20 » »	1.47	2.92	0.016
22 » »		2.92	0.017
25 » »	1.44	2.90	0.017

N° 9

	Acidité totale SO ₄ H ₂ O/oo	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/oo
2-11-1922	0.58		0.079
4 " "	1.91	1.91	0.010
7 " "	1.69	2.93	0.006
9 " "	1.66	3.03	0.010
13 " "	1.47	2.97	0.010
18 " "	1.37	2.98	0.012

Les résultats sont semblables à ceux obtenus dans les expériences précédentes.

Nous avons remarqué en même temps que la fermentation part plus vite et qu'elle est plus vive les premiers jours que dans les expériences déjà mentionnées. Le fait n'est pas surprenant, si l'on pense que le dernier milieu, grâce à sa richesse en phosphate d'ammoniaque, est plus favorable au développement et au fonctionnement de la levure, que ceux utilisés jusqu'ici.

Mais, malgré les quelques milligrammes d'ammoniaque qui sont toujours présents dans le milieu de fermentation, les quantités ajoutées par nous ne constituent pas encore le maximum de ce que la levure peut assimiler dans des conditions normales de fermentation.

En augmentant la dose de phosphate d'ammoniaque ajoutée au milieu, nous sommes arrivés à introduire progressivement jusqu'à 200 milligrammes d'ammoniaque par litre, quantité qui dépasse notablement le maximum que la levure peut assimiler.

Malheureusement, nos prévisions n'ont pas été confirmées par les résultats obtenus ; néanmoins, nous ex-

posons les chiffres qui nous seront utiles pour la documentation de la suite de notre travail.

Dans l'expérience qui suit et dont les résultats figurent sur le tableau n° 10, l'eau de touraillons a reçu 1 gr. de phosphate d'ammoniaque par litre. Comme dans les autres cas, l'expérience a été faite en double, mais nous nous contentons de donner les chiffres d'une de ces expériences dans le tableau suivant :

N° 10			
	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/oo
9-12-1922	0.78		0.135
11 " "	2.45	2.29	0.018
12 " "	2.52	2.86	0.016
15 " "	2.20	2.93	0.021
18 " "	1.98	2.93	0.023
20 " "	1.90		0.024
22 " "	1.90	2.90	0.024

En introduisant dans le liquide de fermentation le phosphate nécessaire pour avoir une proportion de 202 milligrammes d'ammoniaque, nous avons obtenu les résultats du tableau n° 11.

N° 11			
	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/oo
8-1-1923	1.07		0.202
10 " "	2.89	2.36	0.053
12 " "	2.98	3.06	0.050
15 " "	2.57	3.03	0.037
17 " "	2.52		0.040
19 " "	2.79	3.00	0.047
22 " "	2.30	3.02	0.047

Il est à remarquer que les doses croissantes de phosphate d'ammoniaque, que nous ajoutons au liquide de fermentation, augmentent facilement l'acidité initiale du milieu, mais ce fait n'a pas l'air d'influencer l'assimilation et l'excrétion d'azote.

Enfin, dans une dernière expérience de cette série, nous sommes arrivés jusqu'à la dose de 233 milligrammes d'ammoniaque, en introduisant près de 2 gr. de phosphate d'ammoniaque par litre. Les chiffres obtenus sont exposés dans le tableau n° 12.

N° 12

	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/oo
6-1-1923	1.12		0.233
8 " "	2.64	2.57	0.106
10 " "	2.64	2.99	0.104
12 " "	2.69	3.01	0.109
15 " "	2.64	3.03	0.110
17 " "	2.30		0.109
19 " "	2.10	3.00	0.112

Nous pouvons donc conclure qu'en augmentant la dose d'ammoniaque présente dans le liquide on ne modifie qu'insensiblement la quantité excrétée. Nous devons aussi ajouter que, dans toutes ces expériences, nous avons toujours cherché les acides aminés, sans rien trouver à aucun moment de la fermentation. Cela n'est pas surprenant si nous pensons que la levure se trouve dans de bonnes conditions de développement. Sur ce point, nous sommes en parfait accord avec Lampitt qui conclut aussi que l'azote excrété par la levure ne se trouve pas sous forme d'acides aminés.

Influence de la proportion de sucre présent dans le liquide, sur l'excrétion d'ammoniaque.

Dans un travail très intéressant sur l'alimentation azotée de la levure, L.-H. Lampitt (1) affirme que l'augmentation de l'activité zymasique augmente la quantité d'azote excrétée, que cette influence se fait sentir surtout pour des doses de sucre variant entre 1 et 5 o/o et qu'elle est nulle pour des doses dépassant 10 o/o.

Déjà auparavant, dans un travail que nous avons mentionné, A.-L. Stern a écrit que, pour de faibles doses, la quantité d'azote assimilée croît rapidement avec la concentration en sucre.

Comme dans toutes nos expériences mentionnées jusqu'ici, nous avons introduit la dose de 5 o/o de sucre ; les considérations exposées plus haut nous ont amenés à augmenter la dose de sucre, afin d'accroître autant l'assimilation que l'excrétion d'azote par la levure.

Dans la série d'expériences qui suit, nous avons introduit dans le liquide 10 o/o de sucre, en augmentant progressivement la dose d'azote ammoniacal. Nous exposons les résultats de trois de ces expériences seulement, dans les tableaux n^{os} 13, 14 et 15.

N ^o 13	Acidité totale SO ₄ H ₂ O/100	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/100
11-1-1923	0.61		0.077
13 " "	2.18	2.70	0.013
16 " "	2.40	5.80	0.011
18 " "	2.32	6.19	0.010
20 " "	2.15	6.15	0.014
22 " "	1.81	6.16	
24 " "	2.00	6.16	0.013

(1) L.H. LAMPITT. Le métabolisme de l'azote chez le *saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, T. 13, 159, 1919. — *Ann. de la Bras. et de la Dist.* 1920, p. 132, 145, 163.

N° 14

	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/o	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/o
27-1-1923	0.66		0.102
29 " "	1.81	3.01	traces
31 " "	2.87	5.15	traces
2 " "	2.47	6.08	0.011
5 " "	2.25	6.10	0.013
7 " "	2.05	6.08	0.010

N° 15

	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/o	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/o
8-2-1923	0.98		0.148
11 " "	2.20	3.72	0.013
12 " "	2.79	5.39	0.008
14 " "	2.45	6.09	0.012
16 " "	2.26	6.19	0.018
19 " "	2.25		0.017
21 " "	2.15	6.21	0.020

Nous avons fait encore deux autres expériences avec de plus fortes doses d'ammoniaque, mais les résultats étant semblables à ceux des trois tableaux précédents, nous ne jugeons pas utile de les exposer.

Il résulte de cette dernière série d'expérience qu'en passant d'un milieu renfermant 5 o/o de sucre à un autre renfermant 10 o/o, l'excrétion d'ammoniaque par la levure ne subit aucune modification sensible. L'augmentation due à la plus forte dose de sucre, remarquée par Lampitt, ne doit pas nous surprendre, l'auteur ayant étudié l'excrétion d'azote dans son ensemble, alors que nous nous sommes bornés à étudier seulement l'ex-

crétion d'ammoniaque. En plus de cela, dans son expérience sur l'influence de la dose de sucre sur la quantité d'azote excrétée, l'auteur emploie un milieu ne renfermant pas d'aliments azotés pour la levure.

**Influence de la quantité de semence introduite
sur l'excrétion d'ammoniaque par la levure.**

Au sujet de cette question, nous n'avons trouvé qu'un seul renseignement, dans le travail de Lampitt déjà mentionné. L'auteur a ensemencé des solutions de sucre à 10 0/0 avec 10, 20, 40, 80, 150 et 320 cellules de levure par unité de volume et en déterminant l'azote du liquide au bout de 48 heures et 120 heures, il conclut que la quantité d'azote excrétée est proportionnelle au nombre de cellules ensemencées. Il faut ajouter aussi que, dans l'expérience de l'auteur, la levure se trouve dans des conditions de vie tout à fait anormales, le milieu ne renfermant aucune matière azotée.

Dans le même but, nous avons entrepris trois séries d'expériences comparatives. Une série de ballons n'ont reçu comme semence, que deux gouttes d'une émulsion de levure, alors que ceux de l'autre série en recevaient 5 cc. La quantité de semence variait donc notablement. L'eau de touraillons recevait encore 5 0/0 de sucre, 0.5 0/00 d'acide tartrique et du phosphate d'ammoniaque comme dans les autres expériences.

Nous exposons plus bas le résultat de deux de ces expériences.

N° 16

	Acidité totale		Alcool en volume	Ammoniaque
	SO ₄	H ₂ o/oo		
21-3-1923		1.22		0.219
23 » »		2.59	1.97	0.061
26 » »		2.79	3.02	0.049
28 » »		2.49	3.06	0.044
30 » »		2.40	3.06	0.047
3-4 »				0.050
5 » »		2.27	3.03	0.064
9 » »		2.10	3.03	

N° 17

	Acidité totale		Alcool en volume	Ammoniaque
	SO ₄	H ₂ o/oo		
26-3-1923		0.68		0.179
28 » »		2.30	2.11	0.034
30 » »		2.30	2.89	0.038
3-4 »		2.05	2.89	0.040
5 » »		1.86	2.89	0.035
8 » »		1.86		
11 » »		1.76	2.90	0.038

N° 18

	Acidité totale		Alcool en volume	Ammoniaque
	SO ₄	H ₂ o/oo		
16-4-1923		0.75		0.220
18 » »		1.66	1.32	0.140
20 » »		2.40	3.04	0.076
23 » »		1.91	3.30	0.082
25 » »		1.86	3.34	0.088
27 » »		1.78	3.30	
30 » »		1.76		0.090

N° 19

	Acidité totale SO ₄ H ₂ o/oo	Alcool en volume o/o	Ammoniaque o/oo
25-4-1923	0.63		0.191
27 " "	1.60	1.55	0.010
30 " "	1.96	2.89	0.018
2-5 " "	1.93	3.20	0.026
4 " "	1.71	3.26	0.026
7 " "	1.44	3.25	0.024

Dans les expériences 16 et 18, où la quantité de semence introduite a été très faible, l'excrétion a été respectivement de 20 et 14 milligrammes, tandis que dans les expériences 17 à 19, où nous avons introduit une forte dose de levure, l'excrétion a été respectivement de 14 et 16 milligrammes d'ammoniaque par litre.

Il est difficile de tirer de ces chiffres une conclusion bien nette. En tout cas, nous ne pouvons pas affirmer que la quantité de semence introduite influe d'une façon sensible sur l'excrétion d'ammoniaque. Nous avons fait une troisième expérience dans le même but, mais les chiffres obtenus ne nous semblent pas plus intéressants que ceux déjà exposés.

Pour plus de netteté, nous aurions dû introduire dans les expériences 17 et 19 suffisamment de semence pour atteindre le chiffre limite de Brown, de façon à ce qu'il n'y ait plus de multiplication. Mais la difficulté qu'on a eue d'obtenir une dose massive de levure à l'état de parfaite pureté, nous a empêché de tenter l'expérience.

CHAPITRE VI

Quantité maxima d'ammoniaque que la levure est capable d'assimiler.

Dans les expériences que nous avons déjà mentionnées jusqu'ici, nous avons été amenés à augmenter progressivement la quantité d'ammoniaque introduite dans le liquide, afin de donner à la levure la possibilité de se constituer de fortes réserves de matières azotées. Quoique les différentes analyses faites au cours de la fermentation ne nous aient jamais permis de constater l'absence complète de l'ammoniaque dans le milieu, — et cela même pour des doses primitives ne dépassant pas 30 à 40 milligrammes par litre — les quelques milligrammes toujours présents dans le milieu ne nous donnent pas le droit d'affirmer que, dans ces expériences, la levure se trouvait en présence d'un excès d'ammoniaque qu'elle ne pouvait plus assimiler. Il faut considérer la différence entre l'ammoniaque restant à la fin de l'expérience et celle primitivement introduite, et c'est seulement lorsque cette différence n'augmente plus, pour des doses croissantes introduites dans le milieu, qu'on peut parler d'un maximum d'assimilation. Bien entendu, ce chiffre maximum d'assimilation varie avec une foule de facteurs, parmi lesquels il suffit de mentionner la nature et la proportion des aliments minéraux offerts à la levure et des autres principes azotés présents dans le milieu.

Dans un travail publié par Émile Manceau (1), concernant l'assimilation par la levure de l'ammoniaque dans le moût de raisin, nous avons trouvé, au sujet de cette question, quelques chiffres que nous exposons plus bas dans le tableau n° 20.

N° 20

Vin N°	Ammoniaque du moût par litre	Ammoniaque du vin par litre	Ammoniaque absorbée par litre
1	0.206	0.029	0.177
2	0.194	0.013	0.181
3	0.180	0.012	0.168

Pour la facilité des comparaisons, nous avons transformé en ammoniaque les chiffres du travail original qui expriment l'azote ammoniacal.

L'ammoniaque se trouvant en abondance dans ces trois moûts analysés, on peut conclure que la quantité maxima assimilée est d'environ 0 gr. 175 par litre. Naturellement, le moût ayant fermenté spontanément, d'autres microorganismes ont pu accompagner la levure, notamment des bactéries capables de sécréter de l'ammoniaque, de sorte que ce chiffre ne représente pas, d'une manière précise, la capacité d'absorption d'ammoniaque par la levure.

Dans le même ordre d'idées, nous reproduisons d'autres chiffres, publiés par Laborde (2) et qui sont encore

(1) EMILE MANCEAU. Sur les caractères chimiques des vins provenant de vignes atteintes par le Mildew. *C. R. de l'Ac. des Sciences*, T. 137, p. 998.

(2) J. LABORDE. Contribution à l'étude de l'azote contenu dans le vin. *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, 1898, p. 388.

plus intéressants, par le fait que le moût de raisin a été stérilisé et ensemencé ensuite avec de la levure pure, de sorte que le résultat peut être attribué uniquement à la levure.

N° 21

Moûts divers	Ammoniaque du moût	Ammoniaque du vin fermenté		Ammoniaque assimilée	
		à 28°	à 36°	à 28°	à 36°
1	0.1288	0.0012	0.0118	0.1276	0.1170
2	0.1788	0.0039	0.0098	0.1749	0.1690
3	0.1141	0.0054	0.0157	0.1087	0.0984
4	0.1802	0.0092	0.0438	0.1710	0.1364
5	0.1392	0.0084	0.0296	0.1308	0.1096

Comme dans le tableau précédent, nous avons transformé les chiffres de façon à ce qu'ils représentent non pas l'azote ammoniacal, comme dans le travail original, mais l'ammoniaque même.

En outre, nous avons fait la différence entre l'azote du moût et l'azote du vin, pour déduire la quantité d'ammoniaque assimilée.

En considérant la fermentation effectuée à 28°, il faut tout de suite faire la remarque, que les quelques milligrammes d'ammoniaque qui se trouvent dans le milieu à la fin de la fermentation, ne veulent pas du tout dire, comme il résulte de nos expériences antérieures, que la levure s'est trouvée en présence d'un excès d'ammoniaque. Sur les cinq moûts analysés, il n'y en a que deux, les n^{os} 2 et 4, dont on puisse dire qu'ils renferment suffisamment d'ammoniaque, pour que la levure puisse en laisser une partie sans l'utiliser. La quantité assimilée dans ces deux cas se trouve être res-

pectivement de 174 et 171 milligrammes d'ammoniaque par litre, chiffres très approchés de ceux qui résultent du travail d'Emile Manceau, et que nous avons relevés sur le tableau n° 20.

Nous avons essayé aussi d'établir la quantité maxima d'ammoniaque, que la levure peut assimiler dans les conditions de nos expériences. Pour cela, nous avons considéré seulement celles, dans lesquelles la dose d'ammoniaque introduite a été supérieure à celle que la levure peut assimiler. Nous n'avons pas tenu compte, par exemple, d'une expérience où la dose d'ammoniaque restant à la fin de l'opération, était inférieure à 10 milligrammes par litre, étant donné le fait que cette faible proportion se trouve à la fin de la fermentation, même pour des milieux contenant primitivement de faibles quantités d'ammoniaque.

Nos chiffres se trouvent exposés dans le tableau n° 22.

N° 22

	Ammoniaque avant fermentation o/oo	Ammoniaque après fermentation o/oo	Ammoniaque assimilée o/oo	
5 o/o sucre	0.193	0.048	0.145	
	0.202	0.037	0.165	
	0.233	0.104	0.129	
10 o/o sucre	0.196	0.027	0.169	
	0.219	0.044	0.175	Voir les tableaux Nos 16 et 18
	0.179	0.034	0.145	
	0.220	0.076	0.144	Voir les tableaux Nos 17 et 19
	0.191	0.010	0.181	

Nous devons tout d'abord préciser ce que nous comprenons par ammoniaque après fermentation.

En suivant pour une même expérience le chiffre qui exprime la quantité d'ammoniaque présente dans le liquide, on remarque que celui-ci baisse d'abord, passe par un minimum, pour remonter ensuite.

Nous avons considéré le chiffre minimum, étant donné que l'augmentation ultérieure est due au phénomène d'excrétion. En plus de cela, le chiffre minimum ne doit pas être considéré comme absolu, puisque l'excrétion d'azote peut avoir lieu en même temps que l'assimilation.

En considérant les chiffres de la dernière colonne du tableau que nous exposons plus haut, il nous est impossible de tirer une moyenne qui puisse représenter, avec une précision satisfaisante, la quantité maximale d'ammoniaque que la levure peut assimiler. Nos expériences ont été faites tantôt en présence de 5 o/o, tantôt en présence de 10 o/o de sucre ; en plus, dans les quatre dernières, la quantité de levure introduite a varié notablement, et si l'on pense à la plasticité des propriétés physiologiques de la levure, qui varient facilement sous l'influence du milieu ambiant, on s'explique tout de suite la différence entre les chiffres que nous avons obtenus.

Nous avons fait varier dans nos expériences deux facteurs capables d'avoir une influence sur l'assimilation de l'ammoniaque, mais, malheureusement, ces facteurs sont beaucoup plus nombreux. Il suffit de mentionner la température dont l'influence a été mise en évidence par Laborde, la nature des autres aliments azotés présents dans le milieu, et la nutrition minérale de la le-

vure, pour se rendre compte de la complexité du problème. Aussi, la valeur du chiffre qui indique la quantité maxima d'ammoniaque assimilée par la levure, ne peut être réelle que si tous les autres facteurs capables de la modifier sont connus.

CHAPITRE VII

Récapitulation et conclusions générales de la première partie.

I. — Il résulte de la totalité des expériences mentionnées jusqu'ici que la levure déverse dans le liquide de fermentation de l'azote sous forme ammoniacale.

Ce fait nouveau et inattendu présente une importance d'autant plus grande, qu'il nous démontre que la cellule de levure peut excréter un corps qui lui est extrêmement utile pour le développement de ses fonctions et pour lequel elle montre une préférence remarquable.

La quantité d'ammoniaque excrétée varie de 5 à 15 milligrammes par litre, avec une moyenne de 10 milligrammes pour un nombre de dix-sept expériences. Nous voyons donc que, toutes les fois que nous voudrions établir la provenance d'une certaine quantité d'ammoniaque dans un liquide fermenté, il serait prudent de ne pas l'attribuer toujours à l'ammoniaque primitivement présente dans le liquide, ni à l'ingérence de microorganismes désaminants.

Quant à la variation d'une expérience à l'autre, du chiffre indiquant l'excrétion d'ammoniaque, elle ne doit pas trop nous surprendre.

Sans tenir compte du fait que, malgré toutes les précautions prises, il est très difficile de faire deux expériences dans des conditions absolument identiques, et qu'il suffit d'une modification insignifiante du milieu et de la semence, pour faire varier les propriétés de la cellule de levure, on s'explique facilement ces variations, si l'on pense que les analyses au cours d'une même fermentation étaient faites de deux en deux jours, et il est très difficile d'admettre, que l'analyse qui nous donnait le chiffre minimum était faite au même moment de la fermentation pour toutes les expériences.

Ce qui est important pour nous est que, quelles que soient les conditions de nos expériences, le phénomène a toujours été remarqué, sans une seule exception.

Lampitt, dans un travail que nous avons déjà mentionné (1), met en évidence le fait, que l'excrétion d'azote par la levure peut avoir lieu en même temps que l'assimilation. Il résulte de là que le chiffre par lequel nous indiquons la quantité d'ammoniaque présente dans le liquide, à un moment donné, n'est que la somme algébrique d'une soustraction et d'une addition et que s'il n'y avait qu'excrétion, celle-ci se traduirait par un chiffre supérieur à celui obtenu.

Nous nous demandons pourquoi, malgré le grand

(1) L'auteur dose séparément les matières azotées excrétées, en se basant sur l'observation que l'acide phosphotungstique précipite 35 0/0 de l'azote excrété.

nombre de travaux effectués sur l'alimentation azotée de la levure, on n'a pas remarqué d'excrétion d'azote sous forme d'ammoniaque. Cela tient, à notre avis, à la technique qu'on emploie généralement dans l'étude de l'alimentation azotée de la levure.

En effet, pour se rendre compte de la valeur nutritive des matières azotées, il est tout à fait insuffisant de doser ces matières au début et à la fin de la fermentation. Lampitt, dans ses expériences, s'occupe de ce que ces corps deviennent au cours de la fermentation, mais l'auteur étudie globalement les matières azotées, sans s'occuper spécialement de l'ammoniaque.

Laborde, dans des expériences du même genre, différencie l'azote ammoniacal de l'azote organique, mais il ne fait l'analyse qu'au début et à la fin de la fermentation. Il n'y a qu'une seule expérience où l'auteur ait suivi l'ammoniaque tout le long de la fermentation. Nous exposons plus bas les résultats obtenus par lui.

N° 23

Durée de la fermentation	Fermentation à 28°		Fermentation à 38°	
	Azote organique restant	Azote ammoniacal restant	Azote organique restant	Azote ammoniacal restant
1 jour	0 g. 3606	0 g. 0258	0 g. 3456	0 g. 0660
2 jours ...	0 g. 3454	0 g. 0050	0 g. 3242	0 g. 0510
3 — ...	0 g. 3274	0 g. 0036	—	—
6 — ...	0 g. 3048	0 g. 0036	0 g. 3744	0 g. 0276
12 — ...	0 g. 4020	0 g. 0036	0 g. 4224	0 g. 0072
16 — ...	0 g. 4116	0 g. 0036	0 g. 4356	0 g. 0072

De l'expérience de l'auteur, il ne résulte pas que la levure excrète de l'ammoniaque ; seulement, nous ne

trouvons aucune indication sur le stade auquel les dernières analyses ont été faites et nous supposons que l'expérience n'a pas été suffisamment prolongée après la disparition complète du sucre.

Si personne, jusqu'à présent, n'a signalé l'excrétion d'ammoniaque par la levure, il y a des auteurs, par contre, que ce fait pourrait surprendre.

F. Ehrlich (1), par exemple, dans son travail sur la désamination par la levure des acides animés, affirme qu'on ne trouve de l'ammoniaque à aucun moment dans le milieu. Il n'en est pas moins vrai qu'en n'offrant à la levure que des acides aminés comme source d'azote, celle-ci ne doit pas se trouver dans des conditions favorables à une telle excrétion.

Bien plus encore, Pringsheim (2) nie formellement la possibilité d'une production d'ammoniaque par la levure. Pour plus de clarté, nous reproduisons les lignes suivantes extraites des *Annales de la Brasserie et de la Distillerie* (voir cette publication, t. 10, 1907, p. 233) résumant le travail de cet auteur.

« La levure, d'une part, ne produit pas d'ammoniaque et, d'autre part, la distillation en présence de magnésie permet de doser exactement l'ammoniaque en présence de combinaisons organiques azotées facilement

(1) F. EHRLICH. Sur les conditions de la formation d'huile de fusel, ses relations avec la synthèse des albuminoïdes chez la levure. *Ber. der deutsch. chem. Gesellschaft* N° 40, 1027, 1903. — *Annales de la Brass. et de la Dist.*, T. 10, p. 129 et 221, 1907.

(2) H. PRINGHSEIM. Sur l'alimentation azotée de la levure. *Biochemische Zeitschrift*, T. 3, 121-286, 1907.

décomposables. Tous ces avantages font défaut, lorsqu'il s'agit de sources d'azote autres que l'ammoniaque. Si donc on connaît la teneur primitive du milieu en ammoniaque et qu'on détermine l'ammoniaque, ainsi que l'azote dans la levure après fermentation, on peut savoir combien la levure a utilisé d'ammoniaque et combien elle a déversé d'azote dans le liquide au cours de la fermentation. »

Nous avons utilisé pour nos expériences une seule race de levure, que nous avons fait pousser dans deux milieux bien différents : le vin et l'eau de touraillons sucrés. Tout ce que nous pouvons affirmer, par conséquent, c'est que, dans les conditions mentionnées, la levure de champagne « Cramant » excrète de l'ammoniaque.

Malheureusement, nous n'avons pas utilisé une autre race de levure que celle indiquée, de sorte que nous ne pouvons pas généraliser le phénomène, quoiqu'il soit difficile de supposer que l'excrétion d'ammoniaque soit une propriété caractéristique, différentielle, de la levure « Cramant ».

II. — L'excrétion d'ammoniaque par la levure a lieu aussi bien en présence qu'en absence d'acides aminés. Ceci a été vérifié sur le vin et sur l'eau de touraillons. Nous pouvons donc conclure que l'ammoniaque excrétée ne provient pas d'une désamination des acides aminés du milieu, suivant le schéma indiqué par Ehrlich, à moins que ces acides soient le résultat de l'autolyse des vieilles cellules ensemencées.

III. — En passant d'un milieu renfermant 5 o/o à un autre renfermant 10 o/o de sucre, la quantité d'ammoniaque excrétée n'est pas sensiblement modifiée.

Lampitt a démontré que l'azote excrété augmente notablement quand la dose de sucre croît de 1 à 5 o/o, que de 5 à 10 o/o l'influence est minime et qu'au delà de 10 o/o elle ne se fait plus sentir. Nous nous trouvons donc dans la zone où l'influence de la dose de sucre sur l'excrétion d'azote n'est pas sensible.

IV. — La quantité de semence introduite ne semble pas influencer l'excrétion d'ammoniaque.

V. — Elle a lieu aussi bien en milieu favorable, qu'en milieu défavorable au développement de la levure.

VI. — Dans les conditions réalisées dans nos expériences, la levure n'excrète pas d'acides aminés.

Le fait a été vérifié toutes les fois que l'eau de touraillons a été utilisée comme milieu de culture, ainsi que dans une expérience faite sur un vin ne renfermant pas d'acides aminés (voir le tableau n° 3).

On pourrait croire aussi que la levure cède au liquide des acides aminés, mais que ceux-ci sont désaminés ensuite, au fur et à mesure de leur formation (1).

VII. — L'ammoniaque est excrétée vers la fin de la

(1) Sur la présence d'une diastase désaminante chez la levure, on trouve des indications dans un travail publié par Effront. Voir : *C. R. de l'Ac. des Sciences*, T. 146, p. 779. Les résultats de ce travail ont d'ailleurs été vivement combattus par Ehrlich. Voir à ce sujet : *les Annales de la Brass. et de la Dist.*, T. 12, 1909, p. 491.

fermentation, mais le phénomène se poursuit également après la disparition complète du sucre.

VIII. — On trouve de l'ammoniaque dans le milieu à tout moment de la fermentation et cela même pour de faibles doses d'ammoniaque introduites primitivement.

Cela s'explique par le fait que, à la fin de la fermentation, l'excrétion d'azote commence avant que l'assimilation ait pris fin. Les deux phénomènes se passent en même temps, mais la levure étant fatiguée, l'assimilation se trouve ralentie et c'est le phénomène d'excrétion qui l'emporte.

* * *

Lampitt, dans la dernière partie de son travail concernant l'excrétion d'azote, affirme que l'azote excrété n'a pas la même forme que l'azote des acides aminés mis en expérience.

Ehrlich, d'autre part, dit que la matière protéique de la levure ne cède pas au liquide de fermentation, de l'azote sous forme d'acides aminés et que ce phénomène ne pourrait avoir lieu, que si les cellules se trouvaient dans de mauvaises conditions de vie.

D'où provient donc l'ammoniaque que la levure excrète à la fin de la fermentation ?

En pensant aux fonctions déjà connues de la cellule de levure et à la lumière des travaux déjà cités, nous pouvons dire qu'il est fort peu probable que l'am-

moniaque excrétée ait une autre source que les acides aminés.

Tout revient donc à établir, en s'appuyant sur des faits expérimentaux, quelle est l'origine de ces acides, qui par désamination donneraient naissance à de l'ammoniaque.

Nous avons déjà dit : toutes les fois que nous sommes partis d'un liquide ne renfermant pas d'acides aminés à l'origine, ceux-ci n'ont pas apparu au cours de la fermentation. Cette constatation nous permet d'affirmer que l'ammoniaque excrétée ne provient pas d'acides aminés présents dans le milieu de fermentation.

Il ne nous reste plus qu'une source possible : la matière protéique de la levure. Nous pensons qu'à la fin de la fermentation, se trouvant fatiguée et dans de mauvaises conditions de vie, la levure déverse dans le liquide — soit par un phénomène normal de désassimilation, soit par un processus d'autolyse dû aux vieilles cellulesensemencées, — une certaine quantité d'acides aminés. Ceux-ci sont désaminés par la levure, au fur et à mesure de leur formation, mais le ferment se trouvant exténué, il n'est plus capable d'assimiler l'ammoniaque qui en résulte, celle-ci étant en totalité ou non, cédée au milieu.

Cette manière de voir les choses nous paraît juste et elle vérifie aussi toutes les remarques que nous avons faites au cours du présent travail.

Il en résulte que tous les facteurs qui mettent la levure dans l'état d'excréter beaucoup d'acides aminés, et

de produire ainsi une quantité élevée d'huile de fusel, doivent aussi augmenter la quantité d'ammoniaque cédée au liquide. Ce serait là un travail très utile à faire et qui ne manquerait pas de donner des résultats intéressants.

DEUXIEME PARTIE

La levure et l'acidité des milieux de fermentation

CHAPITRE PREMIER

Considérations générales sur l'importance de l'acidité des milieux de fermentation. — Influence de l'acidité sur la levure, et celle de la levure sur l'acidité du milieu.

Le rôle capital que joue l'acidité dans les boissons fermentées en général, a été reconnu par les premiers expérimentateurs qui se sont occupés de la vie du ferment alcoolique.

Alors que pour commencer on s'est contenté de remarquer, que les liquides naturels sucrés, que la levure fait fermenter spontanément sont acides, à mesure que les connaissances sur la levure s'élargissaient, on s'est rendu compte de la complexité du problème et des différents points de vue auxquels il pouvait être envisagé. Ce qui a donné le plus d'importance au problème a été le résultat des dernières recherches effectuées en Allemagne et en Amérique sur la production de la glycérine par la levure, et celui de l'étude très intéressante faite

en France par MM. A. Fernbach et Schœn sur la production de l'acide pyruvique, comme terme intermédiaire dans la formation de l'alcool par fermentation.

Ces travaux ont mis, une fois de plus, en évidence la plasticité des propriétés physiologiques de la cellule de levure. En effet, en modifiant convenablement la réaction du milieu, on a démontré, d'une part, qu'on pouvait changer la voie normale de la dégradation du sucre par la levure et obtenir, non pas de l'alcool, mais de la glycérine ; d'autre part, qu'on pouvait par la même voie capter certains termes intermédiaires entre le sucre et l'alcool et faire produire par la levure beaucoup plus d'acidité qu'elle ne le ferait normalement.

Nous n'avons pas l'intention de nous étendre sur la question de l'influence de l'acidité du milieu sur les propriétés physiologiques de la levure. Nous disons simplement que le milieu faiblement acide convient à la vie de la levure, ainsi qu'à sa fonction de ferment alcoolique. Mais une acidité élevée commence par devenir toxique pour la levure, en empêchant la vie des cellules et la fermentation.

L'action bonne ou mauvaise de l'acidité sur la levure dépend d'une foule de facteurs, dont les plus importants sont : la race de la levure, la composition du milieu, et surtout la nature et la dose de l'acide employé.

On sait également que la fonction végétale de la levure est plus résistante à l'acidité que la fonction de ferment alcoolique et que, pour un acide donné, il faut une dose plus forte pour tuer la cellule que pour arrêter la fermentation.

CHAPITRE II

Influence de la levure sur l'acidité du milieu.

Production d'acidité pendant la fermentation.

Tous les jus sucrés, naturels ou artificiels, qui sont destinés à être fermentés par la levure, ont une réaction acide. Ils conservent leur acidité après la fermentation, mais cette acidité se trouve toujours modifiée. Le plus souvent, il y a augmentation d'acidité, quelquefois diminution, mais toujours une modification de la nature des acides présents. Ces modifications, faciles à relever, ont incité depuis longtemps les expérimentateurs à étudier la production d'acidité par la levure..

En étudiant les produits de la fermentation alcoolique, Pasteur a établi définitivement que la levure produit normalement des acides fixes, comme l'acide succinique, des acides volatils, comme l'acide acétique, mais des méthodes analytiques précises faisant défaut à cette époque, on ne pouvait pas encore se prononcer sur l'origine de ces acides, ni sur les facteurs qui influencent leur production.

Dans ses recherches sur les vins, Duclaux (1) a poussé beaucoup plus loin nos connaissances sur la production d'acidité par la levure. Ses recherches ont porté surtout sur la production d'acidité volatile. Il résulte de son travail qu'une fermentation alcoolique normale produit

(1) E. DUCLAUX. Recherches sur les vins. *Ann. de Chim. et Phys.* 1874, 5^e série.

toujours de l'acide acétique mélangé à 1/12-1/14 d'acides gras supérieurs. Une production trop élevée d'acides volatils est une preuve de fermentation anormale et d'infection du liquide par des microorganismes étrangers. La méthode de dosage des acides gras volatils, établie par Duclaux, exposée en détail dans le troisième mémoire de ses recherches sur les vins, est surtout précieuse. Cette méthode est encore employée aujourd'hui avec beaucoup de succès et permet d'analyser qualitativement et quantitativement les premiers termes de la série des acides gras volatils, dans tous les milieux où ils pourraient prendre naissance et surtout dans les liquides fermentés. Elle est d'une utilité précieuse, notamment dans le dosage des acides volatils des vins, en vue d'établir la nature et la gravité d'une maladie microbienne.

Tandis que les connaissances sur l'acidité volatile étaient déjà bien avancées, l'attention, en ce qui concerne l'acidité fixe, n'était portée que sur la production constante d'acide succinique pendant la fermentation, fait observé et étudié en détail par Pasteur.

Quant au mécanisme de leur formation et à la matière première dont ils dérivent, nos connaissances se sont bien modifiées depuis. Dans son traité de microbiologie (1), Duclaux résume parfaitement les idées qu'on en avait pendant l'époque qui a précédé la publication de son précieux ouvrage :

« Les acides gras sont en général formés en quantité

(1) Voir : Tome III, p. 413.

si faibles dans la fermentation alcoolique qu'ils ne tiennent pour le moment aucune place dans les équations relatives à ce phénomène. »

Et plus loin, parlant de tous les produits de la fermentation alcoolique, Duclaux écrit :

« Tous ces produits, acides gras compris, ont pour source de carbone le sucre, mais ils en proviennent par des voies différentes. Le sucre qui fournit l'alcool n'a pas besoin, nous le savons, de faire partie du protoplasma de la cellule. Au contraire, ainsi que nous allons le voir, les acides gras sont des produits de sécrétion ou d'excrétion du travail protoplasmique. Ils ont été matière vivante, ou faisant partie d'une matière vivante avant de se rencontrer à l'état soluble dans le liquide ambiant. Ils sont le produit d'une action vitale, au même titre que l'alcool est le produit d'une action diastatique. »

Ces idées ont changé depuis, surtout en ce qui concerne l'origine des acides gras produits pendant la fermentation. Les travaux couronnés de succès de F. Ehrlich, dont nous avons parlé dans la première partie de notre travail, ont suffisamment éclairci le problème.

*
* *

Mais les acides volatils ne constituent qu'une catégorie de ce que la levure peut produire comme acidité pendant la fermentation alcoolique. Il a fallu, par conséquent, suivre les variations de l'acidité totale pendant

la fermentation, pour avoir en même temps une idée de ce que la levure peut produire comme acidité fixe.

Les travaux concernant ce problème ont été moins nombreux que ceux effectués sur la production d'acidité volatile par la levure.

C'est depuis qu'on s'est aperçu du grand rôle que joue l'acidité dans la stabilité des boissons fermentées, surtout dans celles qui primitivement sont peu acides, comme la bière et le moût de distillerie, qu'on a donné un peu plus d'importance à l'acidité totale produite par la levure.

L'étude de plusieurs races de levures effectuée par E. Kayser, a prouvé que la production d'acide est une propriété qui varie notablement d'une race de levure à l'autre et que son étude peut servir à caractériser les différentes races. Mais, en raison de la facilité avec laquelle la levure modifie ses propriétés physiologiques sous l'influence du milieu ambiant, il était nécessaire de voir si cette production d'acidité fixe pouvait être considérée comme un caractère différentiel pour chaque race de levure et d'étudier les facteurs qui pourraient la faire varier.

C'est dans ce but que M. A. Fernbach (1) a entrepris une série d'expériences, dont les résultats ont prouvé que la valeur de l'acidité primitive d'un moût, influe considérablement sur la quantité d'acide produite ulté-

(1) A. FERNBACH. L'augmentation d'acidité produite par la levure au cours de la fermentation alcoolique. *Ann. de la Brass. et de la Distil.*, T. 16, 1913, p. 73. — *C. R. de l'Ac. des Sciences*, T. 156, p. 77.

rieurement pendant la fermentation, et qu'en général, celle-ci est d'autant plus grande, que le moût mis en fermentation est moins acide. En raison de son importance, nous donnons ci-dessous un exposé sommaire de ce travail et de ses résultats.

Dans une première expérience, la levure de champagne a été ensemencée dans de l'eau de touraillons sucrée, placée dans des fioles à fond plat. Ces fioles avaient reçu, en outre, des acidités qui, exprimées en acide tartrique, étaient respectivement de 0 gr. 5, 1 gr., 2 gr. et 4 gr. par litre. Au bout de quatre jours, l'analyse du contenu des fioles a donné les résultats suivants :

La consommation du sucre, favorisée d'abord par l'augmentation d'acidité initiale, a été gênée ensuite par des doses d'acide plus fortes. La levure a, en outre, refusé de se développer dans des fioles dont l'acidité initiale dépasse 4 grammes par litre. On remarque encore que l'augmentation de l'acidité est d'autant plus faible que l'acidité initiale est plus forte.

Dans une deuxième expérience, on a offert à la levure du moût de raisin, milieu plus favorable que l'eau de touraillons, à une consommation normale de sucre. Des fioles identiques à celles de la première expérience ont reçu chacune 25 cc de moût de raisin sucré et des acidités respectivement de 0, 1, 4, 8 et 10 grammes d'acide tartrique par litre. L'analyse du contenu des fioles, effectuée après quatre jours, a conduit à des résultats en tout comparables à ceux de l'expérience précédente. Après avoir fait varier le plus possible les conditions de l'expérience, l'auteur conclut :

« Que l'augmentation d'acidité au cours de la fermentation alcoolique, qui est d'autant plus faible que le liquide est primitivement plus acide, est la règle générale dans la vie de la levure. Elle se retrouve dans le cas d'une vie en surface au large contact de l'air, semence rare ou semence abondante, fermentation complète ou incomplète, en un mot, quelles que soient les conditions dans lesquelles la levure est placée. »

Peu de temps après l'apparition de ce travail, J. Ventre (1) a publié des expériences concernant la même question, et dont nous donnons plus bas les conditions et le résultat.

On a fait agir diverses levures elliptiques tirées de crus différents, sur du moût de raisin renfermant 5 gr. 85 d'acidité, exprimée en acide sulfurique par litre, sur un moût artificiel neutre, et sur un moût artificiel renfermant 5 gr. 3 d'acidité par litre, constituée par un mélange de 4 gr. d'acide tartrique, 5 gr. d'acide malique et 1 gr. 85 de carbonate de potasse.

Voici maintenant les conclusions que l'auteur tire de son travail :

1° Chaque levure a une manière propre de produire en quantité déterminée de l'acidité fixe et de l'acidité volatile. La levure de Médoc donne, en effet, au milieu, une acidité supérieure à celles des autres ;

2° On constate, dans les essais en milieu neutre, une

(1) J. VENTRE. Influence des levures et de la constitution initiale du moût sur l'acidité des liquides fermentés. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, T. 157, p. 154. — *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, T. 16, 1913, p. 493.

augmentation d'acidité fixe variant entre 1 et 1.17 o/o du sucre consommé ;

3° Dans les milieux acides naturels ou artificiels, il y a, par contre, une diminution de l'acidité fixe, malgré la production biologique d'une proportion relativement importante d'acide succinique ;

4° Si l'on considère la constitution acide du milieu fermenté artificiel, on se rend compte que l'acide tartrique conserve presque intégralement sa valeur primitive ;

5° Il y aura donc augmentation de l'acidité du moût au cours de la fermentation, dans les milieux neutres, ou quand l'acidité initiale sera constituée uniquement par des acides minéraux ou organiques, faiblement attaqués par la levure, comme l'acide tartrique ;

6° Dans les fermentations viniques, la diminution de l'acidité paraît être due en grande partie à la destruction de l'acide malique (1).

En quelques mots, il résulte de ces deux travaux que nous venons de mentionner, qu'en général, *la levure augmente l'acidité d'un moût qu'elle fait fermenter, d'autant plus que le moût est primitivement moins acide, et l'on peut observer une diminution de l'acidité, quand le moût renferme un acide facilement attaqué par la levure. Dans ce dernier cas, la consommation l'emporte*

(1) Il ne faut pas perdre de vue, non plus, que la précipitation de la crème de tartre entraîne, elle aussi, un abaissement important de l'acidité du liquide.

sur la production d'acidité, sans que pourtant cette dernière cesse d'avoir lieu.

Bien que la production de l'acidité au cours de la fermentation ne représente en valeur que peu de chose, par rapport à la quantité de sucre consommé, il n'est pas moins vrai, qu'elle doit être considérée comme un phénomène normal de la vie de la levure. Cette faculté n'est limitée, pour une levure donnée, que par sa résistance à l'acidité du milieu, et par les moyens dont elle dispose, pour se défendre contre cette influence nuisible. On sait, par exemple, que certains ferments lactiques et butyriques ne peuvent manifester normalement leur faculté de produire des acides que si leur milieu de culture est maintenu constamment neutre.

Ces considérations ont conduit MM. A. Fernbach et Schœn (1) à produire des fermentations en présence de craie et à arriver ainsi à une production considérable d'acides, transformés au fur et à mesure de leur formation, en sels de chaux. Une levure de champagne a donné ainsi une proportion de sels de calcium, représentant 5.5 0/0 du poids du sucre consommé, tandis que la mycoleuvre de Duclaux a donné dans les mêmes conditions un chiffre représentant 25 0/0 du poids du sucre.

(1) A. FERNBACH et SCHOEN. L'acide pyruvique, produit de la vie de la levure. *C. R. Acad. Sciences*, 1913.

Nouvelles observations sur la production de l'acide pyruvique par la levure. *C. R. Acad. Sciences*, 1914.

Nouvelles observations sur la production biochimique de l'acide pyruvique. *C. R. Acad. Sciences*, T. 170, 1920, p. 764.

Un peu plus tard, H. Luers (1) a étudié les changements de l'acidité au cours de la fermentation, en faisant des mesures électrométriques exprimées par le coefficient PH introduit dans la Biologie par Sørensen. Les mesures deviennent ainsi plus précises et les chiffres obtenus se prêtent mieux à une interprétation scientifique.

La levure a été cultivée dans une solution de sucre à 10° Balling renfermant par litre 0 gr. 25 de sulfate de magnésie, 5 gr. de sulfate d'ammoniaque et 5 gr. d'acide phosphorique et rendue alcaline au méthylorange par addition de potasse. La concentration initiale du liquide en ions hydrogène était ainsi de $PH = 5.47$. Deux échantillons fermentés, l'un à 8°, l'autre à 25°, ont eu leur PH en diminution progressive au cours de la fermentation. Après 160 heures de fermentation, le premier donne $PH = 2.73$, tandis que l'autre arrive au même chiffre, après 65 heures. L'augmentation de l'acidité au cours de la fermentation, mesurée par l'augmentation de la concentration des ions hydrogène, est donc assez considérable.

L'auteur a cherché ensuite comment cette levure se comporterait dans un milieu présentant, dès le début, une concentration en ions hydrogène égale à celle que la levure produit normalement. Au moyen d'acide lactique, le même milieu est amené à un $PH = 2.70$. Les

(1) H. LUERS. Les changements de la concentration des ions hydrogène au cours de la fermentation. *Zett. f. d. Ges. Brauwesen*, T. 37, 1914, p. 79. — *Ann. de la Brass. et Distill.*, T. 17, 1914, p. 107.

mesures faites aux différents stades de la fermentation ont prouvé que le PH ne varie que dans des limites très restreintes et n'arrive finalement qu'à la valeur de 2.51.

Ces résultats concordent parfaitement avec ceux obtenus par M. A. Fernbach et qui prouvent que la production d'acidité par la levure est d'autant plus faible que l'acidité du milieu dans lequel elle se développe est plus élevée.

CHAPITRE III

Les changements produits par la levure dans l'acidité du milieu, à la fin et après la fermentation.

Analyse de quelques travaux antérieurs.

La disparition complète du sucre dans un liquide en fermentation, n'entraîne nullement la mort du ferment alcoolique. Si la levure ne peut plus exercer sa fonction de ferment, faute de matière première, elle n'en continue pas moins à vivre et à exercer ses fonctions de cellule végétale. Il en résulte des changements dans la composition chimique du liquide fermenté, qui dépendent, en premier lieu, de la température à laquelle la levure est soumise, ainsi que du temps plus ou moins long, que dure le contact entre le ferment et le liquide fermenté.

Un des plus importants de ces phénomènes, tant par la qualité des produits qui y prennent part, que par leur quantité, est constitué par la diminution de l'aci-

dité après la fermentation. Cette diminution peut être d'ordre purement chimique : éthérification des acides, précipitation de la crème de tartre dans les vins ; d'ordre microbien : présence dans le liquide de ferments de maladies, mais elle peut être aussi attribuable à la levure.

C'est Kulisch (1) qui a observé le premier que ces variations d'acidité pouvaient, dans certains cas, être dues à la levure. Le phénomène avait été remarqué par lui dans des bouteilles de vin complètement remplies et à l'abri de l'air. Après avoir séparé ou tué la levure, Kulisch n'a plus constaté cette diminution d'acidité.

Plus tard, Schukow (2) a cultivé la levure dans des moûts artificiels exempts de sucre, ou en renfermant très peu, et additionnés d'acides malique, tartrique, citrique ou succinique. Il a constaté, que c'était l'acide citrique qui était consommé en plus grande quantité, l'acide malique vient ensuite, alors que les acides tartrique et succinique n'étaient que faiblement attaqués.

Le travail le plus intéressant de tous ceux effectués jusqu'à présent sur la diminution de l'acidité dans les liquides fermentés est celui publié par M. E. Kayser (3), en 1900. C'était la première fois qu'on étudiait

(1) KULISCH. Ueber das Abnehmen der Säure im Obst und Traubenwein während der Gärung und Lagerung. *Weinbau und Weinhandel*, 1889 et 1895.

(2) SCHUKOW. Ueber den Saureverbrauch der Hefen. *Centralbl. f. Bakt. und Parasitenk.* 1896.

(3) E. KAYSER. Contribution à la nutrition intracellulaire des levures. *Ann. Inst. Pasteur*, T. 14, 1900, p. 605.
— *Ann. de la Brass. et Distill.*, T. 3, 1900, p. 433 et 457.

séparément les variations de l'acidité fixe de celles de l'acidité volatile et qu'on définissait ainsi la part du phénomène due à chacune de ces deux catégories d'acides.

La première analyse, pour une expérience donnée, a toujours été faite à la fin de la fermentation, et les résultats donnés par les analyses ultérieures ont été comparés à ceux obtenus dans la première.

Dans une première expérience, une levure de vin a été cultivée dans de l'eau de touraillons à 10 o/o de sucre, additionnée ou non d'acide succinique. On constate, dans les deux milieux, une diminution progressive de l'acidité totale, fixe et volatile. Cette diminution est plus accentuée dans le milieu qui a reçu de l'acide succinique avant la fermentation.

On remarque même une faible production d'acides fixes et d'acides volatils, à la fin de l'expérience, dans le milieu qui n'a pas reçu de l'acide succinique.

Après avoir vérifié le phénomène sur de l'eau de levure, additionnée ou non d'acide succinique, l'auteur étudie les différents facteurs qui pourraient influencer sur la diminution de l'acidité et dont voici les plus importants :

I. — *Influence de la race de la levure*

Toutes les levures ne transforment pas avec la même facilité une même quantité de sucre, en alcool et acide carbonique ; elles ne produisent pas, dans des conditions identiques, les mêmes proportions de glycérine, d'acide succinique ou d'acides volatils. En étudiant

deux levures différentes, l'auteur retrouve également cet écart dans leur propriété de faire baisser l'acidité du liquide fermenté. La différence est plus accentuée pour les chiffres exprimant l'acidité fixe. Chose curieuse: une de ces levures, après une première diminution, fait augmenter l'acidité fixe du milieu.

II. — *Influence des acides fixes du milieu*

La levure a été cultivée dans de l'eau de touraillons sucrée, additionnée de quantités équivalentes d'acides tartrique, malique et citrique. Les trois acides sont brûlés différemment par la même levure et c'est l'acide malique qui disparaît en plus forte quantité. En introduisant des doses différentes d'un même acide, il résulte que les diminutions centésimales sont plus élevées pour des doses faibles d'acide à l'origine.

III. — *Influence de l'acide acétique*

L'acide acétique, produit constant de toute fermentation alcoolique, disparaît plus rapidement que les acides fixes, et dans des proportions d'autant plus fortes que les doses en sont plus élevées. Il semble aussi que l'addition d'acide acétique, à la fin de la fermentation, retarde la disparition des acides fixes.

IV. — *L'acide formique*

En faisant fermenter divers milieux par diverses levures à 10°, 25° et 35°, l'auteur remarque toujours une production d'acide formique. En introduisant une cer-

taine quantité dans le milieu, après la fermentation, la proportion d'acide formique baisse plus vite que celle de l'acide acétique et d'autant plus que la température est plus élevée.

V. — *Acide propionique et acide butyrique*

Il y a des levures qui brûlent l'acide propionique, tandis que d'autres ne l'attaquent pas. En plus, il peut favoriser, tantôt la disparition de l'acide succinique, tantôt celle de l'acide acétique, suivant la race de levure employée. L'acide butyrique n'est que faiblement attaqué par la levure.

Quant au mécanisme de la disparition de ces acides, il peut consister en une combustion ou bien en une transformation en éthers de ceux-ci.

VI. — *La matière azotée*

D'une manière générale, la nature des substances azotées influe nettement sur la variation des acidités des liquides fermentés. Ainsi, par exemple, la peptone facilite la disparition de l'acidité fixe, alors que l'asparagine n'agit que très faiblement.

Quant à l'influence d'une addition de phosphate d'ammoniaque, il en résulte, d'après l'auteur, que dans un tel milieu l'acidité augmente bien plus longtemps que dans les milieux non phosphatés, et ce n'est qu'au bout d'un temps assez long que la diminution de l'aci-

dité commence. Sur ce dernier point, nous allons insister plus loin, lors de la discussion des résultats que nous avons obtenus dans les milieux phosphatés.

VII. — *L'air*

Il facilite, en général, la diminution de l'acidité, non pas par une action chimique directe, mais surtout en favorisant la vie aérobie de la levure.

VIII. — *L'influence de la température*

Dans les limites de température où la levure ne souffre pas, la diminution de l'acidité fixe est plus forte à l'étuve qu'à la cave, tandis que pour l'acidité volatile c'est l'inverse qui a lieu. Mais, dans ces variations d'acidité, il faut également tenir compte du phénomène d'éthérification qui est, lui aussi, fortement influencé par les variations de température.

Un autre travail plus récent, que l'auteur a publié en collaboration avec A. Demolon (1), confirme et complète les résultats exposés plus haut. La vie de la levure après fermentation est étudiée, en suivant les variations subies par l'alcool, l'aldéhyde éthylique, les acides, les éthers et les alcools supérieurs. Il en résulte que la levure continue à vivre après la disparition complète du sucre, en respirant, à la manière de toute cel-

(1) E. KAYSER et A. DEMOLON. Sur la vie de la levure après fermentation. *Ann. de la Brass. et de la Distil.*, T. 12, 1909, p. 313.

lule végétale, aux dépens de matières hydrocarbonées autres que le sucre.

Entre autres, les acides constituent un aliment hydrocarboné pour la levure, lorsque le sucre a disparu, et cela d'autant plus que la température est plus élevée. En plus, l'addition au milieu d'azote assimilable active considérablement la diminution de l'acidité totale qui, dans ce cas, devient maxima.

CHAPITRE IV

Recherches sur la diminution de l'acidité à la fin et après la fermentation alcoolique. — La nature de l'acide aux dépens duquel le phénomène se produit.

Son mécanisme.

Dans nos recherches sur les variations de l'ammoniaque pendant et après la fermentation alcoolique, nous avons été amenés, en vue de mieux suivre l'allure générale du phénomène, à doser non seulement l'ammoniaque, qui nous intéressait spécialement, mais encore l'acidité totale du milieu, comme il résulte des tableaux exposés dans la première partie du travail. Les analyses ont été faites tous les deux ou trois jours, à partir du moment où l'ensemencement a été effectué, et prolongées de dix à douze jours après la disparition com-

plète du sucre. L'acidité totale a toujours été dosée en présence de phénolphtaléine sur une prise de 5 cc.

A cette occasion, nous avons remarqué, qu'à peu près au même moment où la proportion d'ammoniaque commence à augmenter dans le liquide, il se produit une diminution notable dans l'acidité totale du milieu. Ceci a eu lieu dans toutes les expériences où nous avons fait usage d'eau de touraillons comme milieu de culture. Nous nous abstenons de donner les chiffres, ceux-ci se trouvant exposés dans la première partie du travail. (Voir les tableaux n^{os} 6 à 19.)

En ce qui concerne le moment où cette diminution d'acidité se produit, il n'y a rien qui puisse nous étonner, si nous admettons avec M. Kayser, qu'après la fermentation, et en absence complète de sucre, la levure continue à vivre, en brûlant des matières hydrocarbonées autres que le sucre. Ce qui est surprenant, toutefois, c'est la quantité considérable d'acides qui disparaît. En effet, celle-ci dépasse souvent 0 gr. 6 par litre en acide sulfurique et dans le délai de six à douze jours, qui est bien plus court que celui indiqué par M. Kaiser, allant de trois à six mois.

Pour mieux mettre les faits en évidence, nous avons résumé dans le tableau n^o 24 tous les chiffres concernant l'acidité des tableaux dont les numéros vont de 6 à 19 (voir la première partie), en indiquant aussi l'acidité produite par la levure, ainsi que la diminution pour chaque expérience. L'acidité est exprimée en grammes d'acide sulfurique par litre.

N° 24

Numéro du tableau	6	7	8	9	10
Acidité totale initiale.....	0.73	0.71	0.66	0.58	0.78
Acidité maxima	1.86	2.08	2.08	1.91	2.52
Acidité prod. par la levure	1.13	1.37	1.42	1.33	1.74
Acidité min. apr. ferment	1.44	1.47	1.47	1.91	1.90
Diminution d'acidité	0.42	0.61	0.61	0.54	0.62
	11	12	13	14	15
Acidité totale initiale.....	1.07	1.12	0.61	0.66	0.98
Acidité maxima	2.98	2.69	2.40	2.47	2.79
Acidité prod. par la levure	1.91	1.57	1.70	1.81	1.81
Acidité min. apr. ferment	2.30	2.10	1.81	2.05	2.15
Diminution d'acidité	0.68	0.59	0.59	0.42	0.64
	16	17	18	19	
Acidité totale initiale.....	1.22	0.68	0.75	0.63	
Acidité maxima	2.79	2.30	2.40	1.96	
Acidité prod. par la levure	1.57	1.62	1.63	1.33	
Acidité min. apr. ferment	2.10	1.76	1.78	1.44	
Diminution d'acidité	0.69	0.54	0.62	0.52	

Avant d'interpréter les chiffres, nous tenons à attirer l'attention sur les points suivants :

a) L'acidité initiale de l'eau de touraillons a été constituée par addition de 0 gr. 5 d'acide tartrique par litre et de quantités variables de phosphate monoammoniacal. Elle a toujours été dosée en présence de phénolphtaléine et exprimée en grammes d'acide sulfurique par litre ;

b) Les analyses qui nous ont donné le chiffre maximum de l'acidité, n'ont pas toujours été faites forcément au même moment de la fermentation, pour toutes les

expériences ; de plus, nous avons pu précéder ou dépasser d'un jour, le moment où le milieu était le plus riche en acidité. Les chiffres n'ont donc pas une valeur absolue ; néanmoins, ils suffisent à caractériser le phénomène et à tirer certaines conclusions ;

c) Le temps écoulé entre l'analyse donnant le chiffre maximum, et celle donnant le chiffre minimum, varie suivant les expériences de cinq à dix jours. Il en résulte que — bien que la diminution de l'acidité soit à peu de choses près la même dans toutes les expériences — le temps qu'elle a nécessité pour produire a été variable.

Ceci dit, nous pouvons tirer les conclusions suivantes : *La levure provoque dans les liquides fermentés une diminution d'acidité qui, dans les conditions de nos expériences, est à peu près égale à 0 gr. 60 d'acide sulfurique par litre. Le commencement de cette diminution correspond sensiblement avec le moment de la disparition du sucre, mais quelquefois elle peut commencer un peu avant, ou après.*

L'acidité primitive de l'eau de touraillons employée pour les expériences, est relativement faible, variant de 0 gr. 60 à 1 gr. 20 d'acide sulfurique par litre. La levure commence par produire une certaine quantité d'acidité, variable avec l'expérience ; ensuite, elle en fait disparaître une certaine partie, de sorte que si on représentait par un courbe les différentes valeurs que l'acidité totale prend au cours de l'expérience, celle-ci mon-

terait progressivement pendant la fermentation, passerait par un maximum au moment où le sucre disparaît, pour redescendre sensiblement ensuite. Ce fait a toujours été remarqué par nous, sauf dans le cas où le vin sucré a remplacé l'eau de touraillons comme milieu de culture.

Quant à la manière dont cette diminution d'acidité se produit, nous ne pouvons encore rien préciser. On ne pourrait pas l'attribuer à une simple combustion, avant d'établir qu'elle se produit aux dépens de corps que la levure est normalement capable de brûler. Ce qu'il faut retenir tout de suite, c'est le temps relativement court que la diminution nécessite pour se produire, alors que dans les expériences décrites dans le chapitre précédent l'opération devait être prolongée pendant deux ou trois mois.

Au point de vue des matières aux dépens desquelles le fait se produit, nous avons immédiatement pensé à l'acide tartrique, bien qu'il résulte de travaux antérieurs déjà cités, que cet acide n'est que faiblement brûlé par la levure. Le fait que la valeur de la diminution observée s'approchait sensiblement de la quantité d'acide tartrique que nous ajoutions au milieu, ne pouvait pas rester sans attirer notre attention.

En vue de rechercher l'influence que l'acide tartrique pouvait avoir sur le phénomène, nous avons fait une expérience dans laquelle cet acide a été supprimé, l'acidité du milieu étant presque exclusivement due au phosphate monoammoniacal.

N° 25

	Acidité totale SO ₄ H ₂	Alcool en volume o/o	Ammoniaque par litre
23-1-1923.....	0.98		0.161
25 » »	2.47	2.25	0.028
27 » »	2.45	2.96	0.011
29 » »	2.15	2.96	0.020
31 » »	2.10	2.96	0.026
2-2 »	2.08	2.95	0.028
5 » »	1.93	2.95	0.029

Le milieu a reçu 3 o/o de sucre. Comme toujours, la première analyse a été faite tout de suite après l'introduction de la semence.

Il en résulte que la suppression de l'acide tartrique ne change pas l'allure du phénomène. Il y a toujours une diminution d'acidité de 0 gr. 54 d'acide sulfurique par litre, alors que l'assimilation de l'ammoniaque suit la même marche que dans les expériences précédentes.

Nous nous sommes assurés aussi, au moyen du microscope, que le dépôt au fond des ballons ne renfermait pas de cristaux de bitartrate de potassium, dans les expériences où l'acide tartrique avait été introduit primitivement dans le milieu. Il est donc évident que ce n'est pas l'acide tartrique qui disparaît.

Nous avons essayé de voir également, quel serait le rôle de l'acidité volatile dans ces variations. Dans ce but, l'eau de touraillons a été additionnée de 3 o/o de sucre, 0 gr. 5 d'acide tartrique et 0 gr. 5 de phosphate monoammoniacal par litre. L'acidité volatile a été dosée suivant la méthode classique de E. Duclaux, et les chiffres obtenus se trouvent dans le tableau n° 26.

N° 26

	Acidité totale en $\text{SO}_4 \text{H}_2$ o/oo	Acidité volatile $\text{SO}_4 \text{H}_2$ o/oo	Alcool en volume o/o
21-2-1923.....	0.83		
23 " "	1.51	0.17	2.13
26 " "	2.10	0.21	2.97
28 " "	2.00	0.21	3.05
2-3 " "	1.81	0.23	3.07
5 " "	1.71	0.24	3.05
7 " "	1.70	0.23	3.07
12 " "	1.70	0.22	

Il est évident que les faibles variations subies par l'acidité volatile du milieu, ne peuvent pas expliquer la diminution d'acidité, qui dans notre expérience s'élève à 0 gr. 40 d'acide sulfurique par litre.

Les autres acides organiques se trouvant en quantité trop faible dans le milieu, il ne reste plus comme source probable de la diminution d'acidité que l'acide phosphorique, que nous ajoutons au milieu sous forme de sel d'ammoniaque.

En vue de rendre l'eau de touraillons plus favorable au développement de la levure, elle a toujours été additionnée, comme on l'a déjà indiqué dans la première partie, de faibles traces de magnésie. Pour écarter complètement la possibilité d'une précipitation de l'acide phosphorique par le magnésium, nous avons fait des expériences dans lesquelles cette addition a été supprimée, mais les chiffres ne s'en sont pas trouvés changés pour cela.

Il ne restait plus qu'une chose à faire : rechercher par l'analyse ce que l'acide phosphorique devenait au

cours de l'expérience, ou bien préparer un milieu exempt de cet acide. A cet effet, nous avons préparé une eau de touraillons rendue acide par 0 gr. 5 d'acide tartrique par litre, mais dans laquelle le phosphate d'ammoniaque avait été remplacé par du sulfate, les autres conditions de l'expérience restant les mêmes.

Les chiffres donnés par l'analyse sont exposés dans le tableau n° 27.

N° 27

	Acidité totale SO ₄ H ₂ O/100	Alcool en volume O/100	Ammoniaque O/100
9-2-1923.....	0.61		0.078
12 " ".....	1.78	2.88	0.008
14 " ".....	1.61	3.15	0.011
16 " ".....	1.61	3.13	0.011
19 " ".....	1.66	3.12	0.013
21 " ".....	1.59	3.11	0.013
24 " ".....	1.65	3.11	

En regardant les différentes valeurs que l'acidité prend au cours de l'expérience, on peut constater que la courbe qui les représente se trouve être complètement changée. La diminution de l'acidité, sans être nulle, n'est plus représentée maintenant que par un chiffre notablement réduit, par rapport à ceux obtenus jusqu'à présent. *Il est évident que c'est aux dépens de l'acide phosphorique que le phénomène a lieu, puisque son absence le supprime presque complètement.*

Pour mieux nous rendre compte de ces changements dans l'acidité du milieu, nous nous sommes proposé de doser séparément l'acidité, d'une part à l'hélianthine,

d'autre part à la phénophtaléine, pour voir ce que deviennent l'acidité libre d'une part et les phosphates primaires d'autre part. Voici les résultats obtenus :

N° 28

	Phénophtaléine	Hélianthine	Ammoniaque o/oo
26-3-1923.....	0.68	traces	0.179
28 » »	2.30	0.68	0.034
30 » »	2.30	0.68	0.038
3-4 »	2.05	0.63	0.040
5 » »	1.86	0.63	
9 » »	1.86		
11 » »	1.76	0.63	0.038

Comme d'habitude, l'acidité est constituée par l'acide tartrique et le phosphate d'ammoniaque et les chiffres expriment l'acidité en grammes d'acide sulfurique par litre.

En tenant compte du fait que l'hélianthine vire quand toute l'acidité libre se trouve à l'état de phosphate primaire, et la phénophtaléine, quand la saturation est poussée jusqu'au stade de phosphates secondaires, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

L'acidité primitive du milieu se trouve presque entièrement à l'état de phosphates primaires. En ce qui concerne l'acidité libre, elle se forme pendant la fermentation principale, pour rester ensuite stationnaire tout le long de l'expérience. C'est ce qui nous indique la deuxième colonne du précédent tableau.

Quant à la première colonne, elle met en évidence que la diminution de l'acidité a lieu aux dépens des phosphates primaires.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS GÉNÉRALES DE LA DEUXIÈME PARTIE

1° La levure de champagne « Cramant » produit dans les liquides qu'elle a fait fermenter une diminution d'acidité qui commence à peu près au moment de la disparition complète du sucre.

Dans les conditions de nos expériences, elle est d'environ 0 gr. 6 exprimée en acide sulfurique par litre, et elle demande, en moyenne, un temps qui varie de huit à dix jours ;

2° Elle se produit toutes les fois qu'on emploie l'eau de touraillons comme milieu de culture ; par contre, elle n'a pas été observée dans la fermentation de divers vins sucrés, additionnés de phosphate d'ammoniaque ;

3° Cette diminution d'acidité s'effectue aux dépens des phosphates primaires. Les doses de phosphates supérieures à 0 gr. 5 0/00 n'augmentent pas la valeur de l'acidité disparue ;

4° Les acides volatils et les acides fixes, produits par la levure, au cours de la fermentation, ne semblent pas prendre une part active notable au phénomène.

Ces simples constatations, faites par nous, modifient un peu nos connaissances sur les changements que la levure peut produire après la fermentation dans le milieu qui a servi à son développement. A la suite des

travaux publiés par M. Kayser, et dont nous avons déjà parlé, on admettait que la disparition après la fermentation, d'une certaine quantité d'acides, était due à une combustion lente de matières hydrocarbonées, combustion nécessaire à l'entretien de la respiration de la levure, et par conséquent à sa vie, après la disparition du sucre. La combustion de l'alcool et la formation de faibles quantités d'aldéhyde éthylique après la fermentation, doivent être considérées comme provenant toujours du même phénomène. Mais cette combustion effectuée par la levure, est lente, d'après M. Kayser, et demande plusieurs mois à se produire, alors que nous constatons dans nos expériences, qu'il suffit de quelques jours, pour qu'une quantité considérable d'acidité disparaisse. En outre, nous voyons que cette diminution peut porter non seulement sur des matières hydrocarbonées, mais aussi sur des composés minéraux comme l'acide phosphorique.

Que devient l'acidité disparue et quel est le mécanisme de sa disparition ? Malheureusement, les expériences faites par nous ne nous permettent pas d'éclaircir ce point pourtant si important.

Après avoir rejeté la possibilité d'une précipitation de l'acide phosphorique dans le milieu, nous ne pensons pas que cette diminution d'acidité soit due à une absorption d'acide phosphorique par la levure. Bien que nous admettions avec M. Kayser, que l'activité vitale de la levure se poursuit avec beaucoup d'intensité, quand on ajoute au milieu de l'azote ammoniacal, nous ne croyons

pas que la levure soit capable d'absorber, en un temps si court, une quantité si élevée d'acide phosphorique.

L'hypothèse de la formation d'une combinaison phosphorée complexe à poids moléculaire élevé, nous paraît beaucoup plus probable. Ceci s'expliquerait par un phénomène d'éthérification de l'une ou de deux fonctions acides du phosphate primaire, au moyen de matières azotées provenant d'une autolyse de vieilles cellules de levure. La formation de phosphatides renfermant de la glycérine ne nous semble pas impossible, surtout depuis qu'on a signalé la présence de diastases synthétisantes dans les produits d'autolyse de la levure. Ce ne sont là que de simples hypothèses demandant à être vérifiées par la voie de l'expérience.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

<i>Chapitre premier.</i> — Considérations générales sur la nutrition azotée de la levure. Etat de nos connaissances à ce sujet.....	11
<i>Chapitre II.</i> — Excrétion d'azote par la levure. Description de quelques travaux antérieurs....	13
<i>Chapitre III.</i> — Recherches sur l'excrétion d'azote par la levure. Description de la technique employée. Le vin sucré comme milieu de fermentation. Conclusions.....	19
<i>Chapitre IV.</i> — Utilisation de l'eau de touraillons comme milieu de fermentation. Vérification des résultats exposés au chapitre III.....	33
<i>Chapitre V.</i> — Influence sur l'excrétion d'ammoniaque, de la dose d'ammoniaque présente dans le milieu, de la proportion de sucre et de la quantité de semence introduite.....	37

<i>Chapitre VI.</i> — Quantité maxima d'ammoniaque que la levure est capable d'assimiler.....	47
<i>Chapitre VII.</i> — Récapitulation et conclusions gé- nérales de la première partie.....	52

DEUXIEME PARTIE

<i>Chapitre premier.</i> — Considérations générales sur l'importance de l'acidité des milieux de fermenta- tion. Influence de l'acidité sur la levure et celle de la levure sur l'acidité du milieu.....	61
<i>Chapitre II.</i> — Influence de la levure sur l'aci- dité du milieu. Production d'acidité pendant la fermentation	63
<i>Chapitre III.</i> — Les changements produits par la levure dans l'acidité du milieu, à la fin et après la fermentation. Analyse de quelques travaux antérieurs	72
<i>Chapitre IV.</i> — Recherches sur la diminution de l'acidité à la fin et après la fermentation alcoolique. La nature de l'acide aux dépens duquel le phénomène se produit. Son mécanisme.....	78
<i>Chapitre V.</i> — Conclusions générales de la deuxième partie	87

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

La Concentration des Ions " hydrogène "
mesurée par l'indice P_H

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 7 mars 1924.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
M. MOLLIARD.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
P. APPELL.

Imprimerie de la Vie Universitaire, 13, quai Conti, Paris
